



**Tomás Caetano Ferreira dos Santos Correia**

Licenciado em Engenharia Biomédica

## **Controlo electrónico de libertação de fármaco com membranas condutoras de acetato de celulose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Isabel Ferreira    Professora Associada, DCM-FCT/UNL  
Co-orientador: João Paulo Borges    Professor Auxiliar, DCM-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva  
Arguente: Doutora Joana Filipa Quintino Loureiro  
Vogal: Prof. Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira



Controlo electrónico de libertação de fármaco com membranas condutoras de acetato de celulose

Nota: Por opção do autor, a presente dissertação encontra-se escrita no antigo acordo ortográfico.

Direitos de Cópia © Tomás Caetano Ferreira dos Santos Correia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



# Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas que acompanharam ao longo de todo o percurso:

À minha equipa de orientação, Professora Isabel Ferreira e Professor João Paulo Borges, por me terem dado a oportunidade de concretizar este projecto. À Professora Isabel, um muito obrigado pela motivação, disponibilidade, apoio e conhecimento que me transmitiu. À Doutora Ana Baptista, obrigado pela disponibilidade, confiança, apoio, amizade e dedicação.

A todos os elementos do DCM e do CENIMAT, pela disponibilidade na utilização de todos os equipamentos que foram utilizados nesta dissertação.

Agradeço também à Catarina Bianchi, à Suzete Fernandes, ao Paulo Duarte e ao Carlos João por todo o apoio que me proporcionaram sempre que necessitei de ajuda e pela amabilidade com que me trataram.

À Inês Ropio, obrigado pelo apoio, disponibilidade e amizade. Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas de laboratório, Filipa Belo, Susana Oliveira, Susana Marques, Catarina Castro, Ana Filipa, Diana Paiva e André Lúcio, por todo o companheirismo, boa disposição, incentivo e pela partilha de risos e desabafos.

A todos os meus amigos, essenciais para a elaboração da minha dissertação. Obrigado pelo vosso apoio, amizade e motivação que me transmitiram, mesmo nos meus piores momentos.

Por último, um grande *Obrigado* a toda a minha família, em especial aos meus pais, Isabel e Fernando, e ao meu irmão Francisco, por todo o amor e apoio incondicional.



# Resumo

Os actuais métodos de administração de fármacos têm vindo a mostrar-se cada vez menos eficientes, uma vez que a dose que alcança o tecido-alvo é muito inferior à administrada. Desta forma, é frequente a administração de doses elevadas ou mais prolongadas para que surta efeito. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos sistemas de libertação controlada de fármaco com o objectivo de evitar sobredosagens e os consequentes efeitos secundários provocados nos pacientes. A conjugação de propriedades como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, condução eléctrica e encapsulação melhorada numa única estrutura polimérica electrofiada pode ser a próxima geração de sistemas de libertação controlada de fármaco.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um dispositivo com a capacidade de libertar uma substância activa presente no seu interior, o ibuprofeno, em resultado de um estímulo eléctrico.

Começou-se por produzir membranas poliméricas de acetato de celulose e ibuprofeno através da técnica de electrofiação. Estas membranas foram revestidas com polímero condutor polipirrol, através da polimerização *in situ* em solução aquosa do pirrol. A morfologia das membranas antes e após a libertação do fármaco foi avaliada por SEM, verificando-se a deposição contínua de polímero condutor ao longo de toda a fibra e perda de parte do seu revestimento com o ensaio de libertação, responsável pela descida da condutividade eléctrica destas membranas.

Por forma a melhorar a incorporação do fármaco no interior das fibras e também o controlo da sua libertação, produziram-se membranas utilizando a técnica de electrofiação coaxial. Neste caso, o ibuprofeno encontra-se no núcleo da fibra de acetato de celulose. As membranas foram revestidas com polímero condutor polipirrol e realizadas caracterizações quanto à sua morfologia, comportamento eléctrico e electroquímico e na libertação do fármaco. Morfologicamente, através de SEM e TEM, apenas é evidenciada a estrutura coaxial desejada após a libertação do fármaco do seu interior. Também é evidente a falta de uniformidade do revestimento condutor ao longo das fibras, a sua fragilidade e a perda de parte do revestimento com o teste de libertação, responsável pela diminuição da condutividade.

Aos dois tipos de membranas produzidas, foram realizados testes de libertação em meio fisiológico simulado (PBS) em condições de difusão passiva e estimulada. Os resultados mostraram que para as membranas obtidas por electrofiação coaxial, a libertação do fármaco dá-se mais controladamente que nas obtidas por electrofiação convencional. Adicionalmente, nos dois tipos de membranas verificou-se que a difusão passiva dá-se mais rapidamente que em condições estimuladas e que quanto menor o potencial aplicado, mais lentamente se dá a libertação.

Por fim, outro polímero condutor, o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), foi utilizado como

revestimento de membranas de fibras electrofiadas de acetato de celulose contendo ibuprofeno. O protocolo de polimerização adoptado apenas requer que as membranas sejam emergidas em solução aquosa por 15 minutos, em vez dos habituais 65 minutos para a polimerização do polipirrol, dando-se o resto da funcionalização em fase gasosa. Neste caso, a libertação (em condições estimuladas) deu-se de forma similar às membranas de fibras coaxiais revestidas de polipirrol, sugerindo a melhoria na incorporação do fármaco.

Palavras chave: sistemas de libertação controlada de fármaco, acetato de celulose, polímeros condutores, electrofiação, co-electrofiação, polipirrol, poli(3,4-etilenodioxitiofeno), PEDOT, característica de libertação, voltametria cíclica



# Abstract

Current drug delivery methods have been shown less and less efficient, since the dose that reaches the target tissue is much less than the given one. Thus, it is frequent the administration of higher dosages or during more time to take effect. In recent years it has been developed controlled drug delivery systems in order to avoid overdosing and side effects. The combination of properties such as biocompatibility, biodegradability, improved electrical conductivity and improved encapsulation on a single polymeric structure may be the next generation of controlled drug delivery systems.

In this work it was intended to develop a device with the ability to release an active substance therein, the ibuprofen, as a result of electrical stimulation.

Firstly, polymeric membranes of cellulose acetate and ibuprofen were produced by electrospinning. These membranes were coated with polypyrrole conductive polymer, by aqueous *in situ* polymerization of monomer pyrrole. The morphology, before and after the drug release, was evaluated by SEM. Results show a continuous deposition of conductive polymer throughout the fiber. Also, was observed a loss of part of its coating with the release assay, responsible for the decrease of electrical conductivity of these membranes.

In order to improve the incorporation of the drug inside the fibers, and also the control of its release, membranes were produced using the coaxial electrospinning technique. In this case, the ibuprofen is in the core of cellulose acetate fibers. The membranes were coated with polypyrrole conductive polymer and characterizations were carried out as to its morphology, electrical and electrochemical activity and behavior in drug release. Morphologically, through SEM and TEM techniques, it was demonstrated that the desired coaxial structure is visible only after the drug release from its interior. Also evident is the lack of uniformity of the conductive coating along the fibers, their brittleness and loss of the coating with the release-test, responsible for the drop in conductivity.

With the two types of membranes produced, release tests were conducted in simulated physiological medium (PBS) on passive diffusion and stimulated conditions. The results showed that in the membranes obtained by co-electrospinning, drug release occurs in a more controlled way than for those obtained by traditional electrospinning. Additionally, for the two types of membranes, we found that passive diffusion occurs more quickly than in stimulated conditions, and that the lower applied voltage, the slower the release.

Finally, another conducting polymer, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT), was used as a different membrane coating. The polymerization adopted protocol only requires that the membranes are emerged in aqueous solution for 15 minutes instead of the usual 65 minutes for the polymerization of polypyrrole. In this case, the release (in stimulated conditions) took place similarly to coaxial

fiber membranes coated with polypyrrole, suggesting an improvement in the incorporation of the drug within the fibers.

Keywords: controlled drug delivery systems, cellulose acetate, conductive polymers, electrospinning, co-electrospinning, polypyrrole, poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT, drug release profile, cyclic voltametry

# Conteúdo

Resumo	vii
Abstract	ix
Conteúdo	x
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Lista de siglas e acrónimos	xvii
Objectivo	1
1 Introdução	1
1.1 Motivação . . . . .	1
1.2 Revisão da literatura . . . . .	2
2 Materiais e Métodos	7
2.1 Materiais . . . . .	7
2.1.1 Matrizes poliméricas . . . . .	7
2.1.1.1 Acetato de celulose . . . . .	7
2.1.2 Electrofiação . . . . .	8
2.1.2.1 Parâmetros de electrofiação . . . . .	10
2.1.3 Revestimentos Condutores . . . . .	11
2.1.3.1 Polipirrol . . . . .	11
2.1.3.2 Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) . . . . .	12
2.1.4 Fármaco modelo - Ibuprofeno (IBP) . . . . .	13
2.2 Métodos Experimentais . . . . .	14
2.2.1 Produção das membranas . . . . .	14
2.2.1.1 Solução polimérica de AC . . . . .	14
2.2.1.2 Electrofiação . . . . .	14
2.2.1.3 Electrofiação coaxial . . . . .	15
2.2.1.4 Funcionalização com PPy - oxidação in situ em solução aquosa . . . . .	16
2.2.1.5 Funcionalização com PEDOT - polimerização de fase gasosa . . . . .	16
2.2.2 Técnicas de caracterização morfológica . . . . .	17
2.2.2.1 SEM . . . . .	17

2.2.2.2	TEM . . . . .	17
2.2.3	Caracterização eléctrica e electroquímica . . . . .	18
2.2.3.1	Conductividade eléctrica . . . . .	18
2.2.3.2	Voltametria cíclica . . . . .	19
2.2.4	Testes de libertação do fármaco . . . . .	20
2.2.4.1	PBS . . . . .	21
2.2.4.2	Espectroscopia UV-vis . . . . .	21
2.2.4.3	Espectro de referência do IBP . . . . .	22
2.2.4.4	Testes de libertação em PBS . . . . .	22
3	Apresentação e discussão dos resultados . . . . .	25
3.1	Análise morfológica . . . . .	25
3.1.1	Membranas de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas por PPy . . . . .	25
3.1.2	Membranas de fibras coaxiais de AC(out):IBP(in) revestidas por PPy . . . . .	27
3.1.3	Membranas de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas por PEDOT . . . . .	31
3.2	Libertação do fármaco em PBS . . . . .	32
3.2.1	Curva de calibração do IBP em PBS . . . . .	33
3.2.2	Testes de libertação . . . . .	34
3.3	Medidas eléctricas . . . . .	40
3.3.1	Condutividade - curvas I-V . . . . .	40
3.3.2	Voltametria cíclica . . . . .	42
4	Conclusões e perspectivas futuras . . . . .	45
	Bibliografia . . . . .	49
A	Espectros e perfis de libertação do fármaco . . . . .	53

# Lista de Figuras

1.1	Voltamograma cíclico característico para eléctrodos revestidos por polipirrol e dexametasona, estudo realizado por Wadhwa et al. (2006) . . . . .	6
2.1	Unidade repetitiva do acetato de celulose . . . . .	8
2.2	Montagem convencional utilizado em electrofiação . . . . .	9
2.3	Montagem utilizado em electrofiação coaxial . . . . .	9
2.4	Reacção química do polipirrol . . . . .	12
2.5	Polimerização electroquímica do pirrol em polipirrol . . . . .	12
2.6	Estrutura química do ibuprofeno . . . . .	13
2.7	Montagem do sistema de electrofiação coaxial utilizado. . . . .	15
2.8	Fotografia do microprovador para registo das curvas I-V . . . . .	18
2.9	Exemplo de voltamograma cíclico típico para o PPy . . . . .	20
2.10	Montagem experimental adoptada para os testes de libertação. . . . .	23
3.1	Imagens de SEM electrofiadas de AC:IBP revestidas com PPy, antes do ensaio de libertação do fármaco . . . . .	26
3.2	Imagens de SEM de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas com PPy, depois do ensaio de libertação do fármaco . . . . .	26
3.3	Imagens de SEM da secção das membranas de fibras coaxiais de AC(out):IBP(in) sem revestimento. . . . .	28
3.4	Imagens de TEM de fibras coaxiais de AC(out):IBP(in) sem revestimento . . . . .	28
3.5	Imagens de SEM da secção das membranas de AC(out):IBP(in) revestidas com PPy . . . . .	29
3.6	Imagens de TEM de fibras coaxiais de AC(out):IBP(in) revestidas com PPy, antes e depois da libertação do fármaco . . . . .	30
3.7	Imagem de TEM de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas com PEDOT antes e depois da libertação do fármaco . . . . .	32
3.8	Espectro e curva de referência do IBP em PBS . . . . .	33
3.9	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão passiva membranas de AC:IBP electrofiadas e funcionalizadas com PPy . . . . .	34
3.10	Característica de libertação normalizada para a difusão passiva de membranas de AC:IBP electrofiadas e funcionalizadas com PPy . . . . .	35
3.11	Características de libertação normalizadas para membranas de AC:IBP electrofiadas e funcionalizadas com PPy, para todas as condições testadas . . . . .	36
3.12	Características de libertação normalizadas para membranas co-electrofiadas de AC:IBP funcionalizadas com PPy, para as condições estimuladas e passivas . . . . .	37

3.13	Comparação das características de libertação de fibras de AC:IBP electrofiadas pelos dois métodos e funcionalizadas com PPy, para as condições estimuladas e passivas . . .	38
3.14	Comparação das características de libertação de fibras de AC:IBP electrofiadas pelo método convencional e funcionalizadas com PPy e PEDOT, para a condição estimulada de +0.15 V . . . . .	39
3.15	Curva corrente-tensão obtida para uma membrana electrofiada e revestida por PPy, para a condição de difusão passiva (não estimulada) antes do ensaio de libertação . . .	40
3.16	Voltamogramas do 5º e 30º ciclos para as membranas de AC:IBP produzidas por electrofição convencional e coaxial, revestidas com PPy. . . . .	42
A.1	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão de membranas electrofiadas não revestidas de AC:IBP . . . . .	53
A.2	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão passiva e 0V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPy . . . . .	54
A.3	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 0,15V e 0,5V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPy . . . . .	55
A.4	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 1V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPy e para a difusão em membranas de fibras coaxiais não revestidas de AC(out):IBP(in) . . . . .	56
A.5	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão passiva e para 0V de membranas co-electrofiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy . . . .	57
A.6	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 0,15V e 0,5V de membranas co-electrofiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy . . . . .	58
A.7	Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 1V de membranas co-electrofiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy, e para 0,15V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PEDOT . . . . .	59

# Lista de Tabelas

2.1	Parâmetros utilizados na produção de membranas de AC-IBP por electrofiação convencional. . . . .	15
2.2	Parâmetros utilizados na produção de membranas de AC/IBP por electrofiação coaxial. . . . .	16
2.3	Parâmetros utilizados para a obtenção das curvas características I-V. . . . .	19
2.4	Sais utilizados na preparação da solução <i>stock</i> (10×) de PBS. . . . .	21
2.5	Soluções padrão preparadas para a curva de calibração IBP/PBS. . . . .	22
2.6	Discriminação dos testes de libertação de fármaco realizados às membranas produzidas . . . . .	23
3.1	Estimativas das condutividades das membranas electrofiadas convencionalmente e coaxialmente, revestidas de PPy ou PEDOT, antes e depois dos ensaios de libertação . . . . .	41





# Lista de siglas e acrónimos

A lista que segue contém as siglas e acrónimos usados ao longo deste trabalho.

AC	Acetato de celulose
DMAc	dimetilacetamida
TEM	do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>
SEM	do inglês, <i>Scanning Electron Microscopy</i>
PPy	Polipirrol
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto de ferro (III)
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
APS	Persulfato de amónia
VC	Voltametria cíclica
$E_p$	Pico de potencial
$i_p$	Corrente de pico
$j_p$	Densidade de corrente de pico
PBS	do inglês, <i>Phosphine Buffered Solution</i>
PVP	polivinilpirrolidona
PEDOT	poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Sulfato de ferro
IBP	ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico)
ID	do inglês, <i>inner diameter</i>
OD	do inglês, <i>outer diameter</i>
mAC:IBP/PPy	Membranas de fibras electrofiadas de acetato de celulose e ibuprofeno, revestidas de polipirrol
cAC:IBP	Membranas co-electrofiadas de acetato de celulose (out) e ibuprofeno (in), sem revestimento condutor
cAC:IBP/PPy	Membranas co-electrofiadas de acetato de celulose (out) e ibuprofeno (in), revestidas de polipirrol
mAC:IBP/PEDOT	Membranas electrofiadas de acetato de celulose e ibuprofeno, revestidas de PEDOT
$\sigma$	Condutividade eléctrica, cuja unidade é <i>S/cm</i> (Simens por centímetro)



# Objectivo

Este trabalho, desenvolvido no Departamento de Ciências dos Materiais da Universidade Nova de Lisboa, tem como objectivo o desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármaco com possível aplicação ao nível transdérmico. O controlo deste sistema efectua-se electricamente, por aplicação de estímulos eléctricos, libertando a substância ativa encapsulada no seu interior.

Um sistema com estas características deve contemplar: o encapsulamento do fármaco, a libertação eletronicamente controlada, flexibilidade e biocompatibilidade.

O presente estudo foi realizado em quatro etapas distintas:

- (i) Reprodução de resultados obtidos em trabalhos anteriores, nomeadamente trabalhos desenvolvidos em paralelo com a presente dissertação e o trabalho *Biodispositivos electronicos multifuncionais*, da autoria da Mestre Beatriz Romba sob a orientação da Prof. Doutora Isabel Ferreira, e co-orientação do Prof. Doutor João Paulo Borges e da Doutora Ana Baptista.
- (ii) Produção de membranas poliméricas de AC com incorporação de fármaco e com revestimento condutor - e membranas de fibras coaxiais revestidas com polímero condutor;
- (iii) Caracterização morfológica, eléctrica e electroquímica das membranas produzidas.
- (iv) Testes de libertação do fármaco, controlada electronicamente, em meio fisiológico simulado.

Nos quatro capítulos que se seguem, encontram-se os resultados do trabalho desenvolvido. No Capítulo 1 é apresentado um estado da arte na área dos sistemas de libertação de fármaco. No Capítulo 2 descrevem-se os componentes do biodispositivo proposto e os métodos utilizados para a sua caracterização. No Capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados experimentais, seguindo-se o Capítulo 4 onde se referem as conclusões e as perspectivas futuras.



# Capítulo 1

## Introdução

Neste capítulo introduzir-se-ão os sistemas de libertação controlada de fármaco, algumas das suas características e vantagens face aos actuais métodos de administração. Apresenta-se um resumo da revisão da literatura sobre esta temática, nomeadamente no que toca às técnicas de *electrospinning* e *co-electrospinning* de acetato de celulose e ao uso de polímeros condutores como o polipirrol e o poli(3,4-etilenodioxitiofeno).

### 1.1 Motivação

Tradicionalmente, a administração de fármacos é feita ou sob a forma de comprimidos, de xaropes (suspensões aquosas), ou ainda sob a forma de injectáveis. Em qualquer dos casos, a dose de medicamento que alcança o tecido-alvo é sempre muito inferior à administrada, já que grande parte da dosagem, ao circular pelo organismo, acaba desperdiçada ou metabolizada noutros tecidos. Torna-se assim necessário a administração de uma dose superior ao necessário ou mais prolongada para que surta efeito [1], resultando numa concentração sanguínea inconstante de fármaco, caracterizada por um pico seguido de declínio exponencial entre aplicações. Desta forma, é seguro afirmar que estes métodos apresentam desvantagens e como tal, outras formas de medicar devem ser desenvolvidas para a sua optimização. Mais recentemente, têm-se desenvolvido fármacos cada vez mais potentes, à base de proteínas e DNA, que apresentam toxicidade associada aos picos de libertação, devendo ser controladas a concentração sanguínea e o local de administração.

Os sistemas de libertação controlada de fármaco aparecem como forma de tentar ultrapassar os problemas mencionados, nomeadamente melhorando a eficiência terapêutica, reduzindo a toxicidade, aumentando o tempo de circulação no organismo, controlando as taxas de libertação, reduzindo a frequência de administração das doses e melhorando a *compliance* do paciente. Tipicamente, estes sistemas são compostos por um material de suporte, de preferência biodegradável, que funciona como transportador da substância activa até ao local onde será libertado. A biodegradabilidade é uma característica importante já que evita a necessidade de explantação. No entanto, esta característica acrescenta complexidade ao mecanismo de libertação uma vez que o material pode começar a degradar-se durante a libertação (os não biodegradáveis fazem-no apenas por difusão da substância activa). Por esta razão, os sistemas disponíveis comercialmente, na sua maioria, funcionam somente por difusão

da substância activa ao nível transdérmico.

Relativamente aos portadores de fármacos (poliméricos, sintéticos e biodegradáveis) hoje estudados, dividem-se em quatro categorias [2]:

1. *Nano- e micropartículas*. Neste caso, é fácil a incorporação dos fármacos no interior das partículas, mas o controlo da libertação nem sempre o é, devido à grande área superficial das partículas.
2. *Hidrogéis*. Possuem a vantagem de não necessitarem de solventes e de serem injectáveis (sem necessidade de implantação cirúrgica). No entanto, apenas são aplicáveis em fármacos hidrofílicos.
3. *Micelas poliméricas*. Quando comparadas aos hidrogéis, adaptam-se melhor a fármacos hidrofóbicos, uma vez que possuem estrutura *core-shell* em água, com núcleo hidrófobo para encapsular a substância activa e *shell* hidrofílico para protecção do fármaco.
4. *Matrizes fibrosas*. Mais recentemente, as matrizes fibrosas, como as fabricadas por electrofiação, têm sido muito aplicadas em biomédica. Em 2008, Sill e von Recum [3] estudaram as aplicações do *electrospinning* em sistemas de libertação controlada de fármaco e em engenharia de tecidos, mais precisamente diversos métodos da sua incorporação em matrizes fibrosas: por revestimento, encapsulação coaxial ou embebendo numa solução que contenha o fármaco. Estas matrizes poliméricas podem ser utilizadas tanto em fármacos hidrofílicos como nos hidrofóbicos. O perfil de libertação do fármaco pode ser assim controlado através da optimização da morfologia, porosidade e composição da matriz. Por um lado, esta solução oferece especificidade relativamente ao local de libertação. Por outro, a necessidade de cirurgia para a sua implantação é uma desvantagem deste tipo de tecnologia.

Assim, para se obter o máximo proveito neste tipo de sistemas, é necessário conhecer todas as variáveis como o material que os constituem e as suas possíveis interações com tecido vivo. Outros parâmetros igualmente importantes são o tipo de substância activa utilizado, a forma de o encapsular no portador, o mecanismo da sua libertação, a via de administração e o tecido-alvo.

Conforme mencionado, a maioria dos sistemas de libertação controlada de fármacos desenvolvidos e em circulação assentam na aplicação transdérmica por difusão. No entanto, as membranas poliméricas intrinsecamente condutoras têm vindo a ser alvo de intensa investigação, já que oferecem uma nova forma eficiente de controlar a libertação de fármacos à taxa desejada. Ora, a conjugação de propriedades como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, condução eléctrica e encapsulação melhorada numa única estrutura polimérica electrofiada pode vir a tornar-se a próxima geração de sistemas controlados de libertação de fármaco.

## 1.2 Revisão da literatura

A produção de fibras por *electrospinning* tem revelado ser, nos últimos anos, uma técnica prometedora na produção de suportes para substâncias activas. Em 2003, Zeng [4] estudou a influência de surfactantes e fármacos no diâmetro e uniformidade de fibras de poli-L-ácido láctico (PLLA) electrofiadas. Relativamente aos efeitos dos surfactantes, concluiu-se que estes diminuem o diâmetro e alteram a distribuição das fibras. Por outro lado, este grupo ainda provou que, ao encapsular no interior da fibra diferentes percentagens de diferentes fármacos, a inclusão no polímero era diferente para cada um deles, devendo-se às diferenças de solubilidade e de compatibilidade do fármaco no sistema

fármaco-polímero-solvente.

Em 2007, Tungprapa [5] estudou a libertação de quatro fármacos (cujo peso corresponde a 20% da membrana electrofiada) presentes no interior de fibras de acetato de celulose (AC). Filmes do mesmo polímero e com a mesma proporção de fármaco foram produzidos para fins comparativos. Os resultados demonstraram que as fibras continham mais fármaco no seu interior (84% a 93% relativamente ao peso inicial), comparativamente aos filmes (81% a 90%). Esta diferença deve-se ao facto das fibras possuírem maior área de superfície.

Ainda no mesmo ano, Bolgen e a sua equipa [6] adsorveram antibiótico em matrizes de polycaprolactona (PCL) electrofiado testando-o *in vivo*, com o objectivo de estudar as características de libertação. Obtiveram pois um pico na libertação, três horas depois da implantação, indiciando a falta de eficiência do método de adsorção para concentrações altas de fármaco. Neste caso, devido ao processo de *electrospinning* que provoca a evaporação rápida do solvente e devido à elevada força iónica do sistema, as partículas de fármaco tendem a ficar na superfície das nanofibras de polímero. Desta forma, ao se implantar o *scaffold*, as partículas de fármaco serão libertadas mais abruptamente, provocando o pico de libertação observado. Concluindo-se assim que as características de libertação são altamente dependentes de quão bem o fármaco se encontra encapsulado no portador.

Em 2009, Kenawy e a sua equipa [7] processaram nanofibras electrofiadas como sistemas de libertação de fármacos para aplicações pós-operatório. Fabricaram fibras de PCL (biodegradável), poliuretano (não biodegradável) e uma mistura dos dois polímeros anteriores, contendo cetoprofeno, um anti-inflamatório não-esteróide. Os resultados obtidos mostraram que, para todos os materiais, a taxa de libertação era idêntica. No entanto, verificaram-se melhorias das propriedades mecânicas na mistura dos dois polímeros.

Apesar dos resultados obtidos para a libertação controlada utilizando fibras poliméricas (uniaxiais) serem positivos, na maior parte dos casos existe um pico na libertação do fármaco, poucos momentos depois da implantação que pode, ainda assim, gerar toxicidade. De forma a ultrapassar este problema, podem-se produzir nanofibras compósitas com estrutura *core-shell* análoga às fibras de seda de aranha, um método mais eficaz na inclusão de fármacos em fibras poliméricas [8]. Como se trata de um processo de electrofiação que envolve geralmente dois polímeros diferentes, ou de duas fases diferentes (para o mesmo polímero), os parâmetros devem ser cautelosamente estudados de forma a otimizar a produção das fibras.

Em 2003, Sun et al. [9] produziram, pela primeira vez, fibras coaxiais poliméricas, através de soluções de 2% (em peso) de concentração do mesmo polímero (poli-óxido de etileno, PEO), carregadas com 0.2% a 2% (em peso) de bromofenol. Neste caso, obtiveram-se fibras com diâmetro total 3  $\mu\text{m}$ , sendo 2  $\mu\text{m}$  o diâmetro interno, evidenciando-se a existência de uma estrutura coaxial. Outras fibras, também coaxiais, compostas por dois polímeros diferentes (3% (em peso) de PEO/8% (em peso) de polissulfona) foram produzidas. Obtiveram-se fibras com diâmetro total na ordem dos 60 nm sendo o interno de 40 nm. Em qualquer dos casos, as fibras produzidas permaneceram coaxiais, independentemente da sua constituição, permitindo com esta tecnologia processar soluções poliméricas que doutra forma não seriam possíveis de electrofiar.

No ano seguinte, Zhang e a sua equipa [10] fabricaram uma estrutura compósita de PCL e gelatina. Por observação de microscopia electrónica de transmissão (TEM) e por difracção de raios-x, confirmou-se o encapsulamento da gelatina no PCL, conforme esperado. Adicionalmente, o grupo

estudou o efeito da variação da concentração dos polímeros. Em ambos os casos, verificou-se que aumentando a concentração, os diâmetros aumentam na mesma proporção.

Em 2005, Jiang et al. [11] prepararam fibras coaxiais com núcleo de polietilenoglicol (PEG) e PCL no exterior, ambos biodegradáveis. Dois fármacos foram encapsulados no núcleo: proteína BSA e lisozima. Observaram que ajustando o caudal do polímero do núcleo, as espessuras alteravam-se, afectando os perfis de libertação das proteínas incorporadas. Através de estudos da actividade enzimática, concluiu-se que a lisozima manteve a sua estrutura e bioactividade. Este resultado deve-se à existência da bainha exterior de PCL, "sacrificada" antes da degradação do núcleo de PEG, salvaguardando assim as proteínas, evitando ao mesmo tempo um pico na sua libertação [8].

Huang e a sua equipa (2006) [12], utilizaram resveratrol (um antioxidante) e sulfato de gentamicina (um antibiótico), ambos de baixo peso molecular e sem qualquer polímero adicional (apenas os respectivos solventes), encapsulados no interior de uma bainha de PCL co-electrofiado, apesar dos fármacos, por si só, não conseguirem formar fibras. Para tal, o grupo testou diferentes concentrações de fármaco de forma a se obter diferentes fibras ultrafinas, utilizando solventes imiscíveis e miscíveis com o solvente do PCL. Mostraram que quando a solução do núcleo era miscível com a solução de PCL, um aumento da concentração de fármaco originaria fibras com menos contas, logo de melhor qualidade. No entanto, se a solução for imiscível com a solução de PCL, um aumento na concentração do núcleo pode originar a formação de mais contas, comprometendo as propriedades mecânicas da matriz polimérica. Além disso, devido a diferenças na hidrofiliabilidade das soluções nucleares, foram verificadas velocidades de degradação distintas para os dois tipos de fibras produzidas sendo a libertação dos fármacos dependente desta degradação. No mesmo ano, He et al. [8] produziram fibras coaxiais com núcleo de hidróclorato de tetraciclina e bainha de PLLA, tendo obtido os mesmos resultados que os autores do estudo anterior, além de que soluções de concentrações menores de PLLA, ou seja de menor viscosidade, facilitaram a formação de fibras com diâmetros mais uniformemente distribuídos e menos variantes. Ainda no mesmo estudo, os autores adoptaram um tratamento químico e térmico das fibras, por forma a melhorar as propriedades mecânicas e térmicas.

Como evidenciado nos parágrafos anteriores, a utilização de fibras compósitas produzidas por electrofiação coaxial, permite maior controlo na entrega de fármacos uma vez que elimina a toxicidade associada a picos de libertação. O controlo destes sistemas dá-se principalmente devido à lenta degradação do polímero externo, enquanto ocorre a libertação do fármaco que se encontra no núcleo. No entanto, para que seja possível a elaboração de um sistema que responda a estímulos eléctricos, é necessário que a membrana que possui o fármaco seja condutora. Tal pode ser possível utilizando um polímero condutor como o polipirrol e o poli(3,4-etilenodioxitiofeno). O revestimento de fibras uniaxiais electrofiadas por soluções poliméricas condutoras tem sido alvo de intenso estudo devido à descoberta de novos tipos destes polímeros. O polipirrol (PPy), polímero condutor, biocompatível e dopável com diversos fármacos e enzimas é, habitualmente, o material escolhido para aplicações em que é necessária a libertação de substâncias activas aquando da aplicação de um estímulo eléctrico.

A primeira vez que se reportou o uso do PPy como membrana condutora para controlo de sistemas de libertação foi em 1998 por Kontturi, Pentti e Sundholm [13]. Estes autores testaram o polímero condutor na libertação de três substâncias diferentes, ácido salicílico, naproxeno e vitamina C, todos eles aniónicos. Adicionalmente estudaram a libertação do grupo p-toluenossulfonilo, usado na electrossíntese da membrana. Concluíram que a membrana se manteve estável e que menos de 5% da substância aniónica se libertou espontaneamente. Também obtiveram um resultado que confirmou a



utilidade deste tipo de polímeros nestes sistemas: que ao se aplicar potenciais sucessivos à membrana, todas as substâncias, excepto a vitamina C, foram libertas da membrana de uma forma controlada. Adicionalmente, os mesmos autores chegaram à conclusão que estas membranas funcionam como bombas iónicas, em que a compensação da carga ocorre através do movimento iónico para dentro e fora da membrana, num processo denominado percolação.

Em 2010, Müller [14] conseguiu revestir membranas de celulose bacteriana com PPy, através da polimerização *in situ* do pirrol. Neste caso, a membrana é colocada numa solução aquosa de pirrol, dando-se a polimerização do monómero pela adição de cloreto de ferro (III),  $\text{FeCl}_3$ , como catalisador. Dos testes realizados, observou-se que a espessura e resistência eléctrica da membrana compósita (celulose-PPy) é dependente da concentração de PPy no meio onde se dá a reacção e do seu tempo de duração. A resistência eléctrica da membrana alterou-se de  $9.1 \times 10^{-12} \Omega\text{cm}$  para  $0.33 \Omega\text{cm}$  dada a formação de uma camada contínua de PPy. Para o valor da menor resistividade, foi necessária uma concentração de  $0.03 \text{ mol.l}^{-1}$  de pirrol, e um tempo de 90 min para a reacção de polimerização.

No ano que se seguiu, Badgujar [15] preparou fibras de celulose vegetal e PMMA com PPy, utilizando um processo semelhante ao do estudo anterior. O agente oxidante utilizado foi o  $\text{FeCl}_3$  e a reacção de polimerização do pirrol deu-se em meio aquoso durante quatro horas. Para estudar a influência do tratamento da superfície das fibras na condutividade, utilizaram-se três compostos distintos: água destilada, hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ). Os testes realizados revelaram que a condutividade foi máxima para as fibras tratadas com  $\text{Ca(OH)}_2$  ( $3.078 \text{ S/cm}$ ) enquanto que para as fibras que não foram tratadas, a condutividade foi menor ( $1.98 \text{ S/cm}$ ).

Em 2013, Müller [16] volta a estudar as propriedades e estrutura de compósitos de celulose bacteriana e PPy. Neste caso a polimerização do pirrol deu-se *in situ*, via polimerização oxidativa, usando dois agentes oxidantes distintos: o persulfato de amónia (APS) e o cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). No primeiro caso, as nanopartículas esféricas condutoras de PPy ficaram uniformemente distribuídas na superfície das fibras. No segundo caso, formou-se uma camada polimérica condutora contínua sobre as fibras de celulose, com condutividade cem vezes superior às fibras em que se utilizou APS como agente catalítico. Este resultado deve-se às diferenças de afinidades entre os grupos funcionais, que é maior quando se utiliza o  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como agente oxidante.

Mais recentemente, Tang (2015) [17] produziu membranas compósitas flexíveis e condutoras, uma vez mais através da síntese química *in situ* do pirrol na presença de celulose bacteriana, tendo posteriormente tratado a membrana com uma solução de polisiloxano. Os resultados obtidos evidenciam uma estrutura contínua constituída pelas partículas de PPy depositadas à superfície da celulose. Com o tratamento de polisiloxano, as fibras passaram de altamente hidrofílicas a hidrofóbicas. Estes resultados demonstram que é possível alterar o comportamento das fibras relativamente à água, sem comprometer a condutividade do PPy, alargando o espectro de possíveis fármacos que se podem incorporar nas fibras.

Relativamente à libertação controlada de fármacos associada à estimulação eléctrica de membranas poliméricas intrínsecamente condutoras, embora ainda não aplicados ao ser humano, existem desenvolvimentos de alguns destes sistemas funcionais. Em 2006, Wadhwa [18] desenvolveu um dos primeiros sistemas de libertação de fármacos, cujo controlo é realizado electronicamente. Este consiste em dois eléctrodos, sobre os quais é depositado um filme de PPy (por electropolimerização do pirrol) contendo dexametasona (anti-inflamatório) que, devido à sua carga negativa, funciona como dopante do polímero condutor. Foi realizada a libertação do fármaco utilizando a técnica de volta-

metria cíclica (VC) em PBS. Ao fim de 1 e de 30 ciclos de VC libertaram-se, respectivamente,  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fármaco. Além disso, só a partir do terceiro ciclo de VC aparecem os picos de oxidação e redução característicos do pirrol e à medida que decorrem mais ciclos, mais intensos se tornam estes picos. Na Figura 1.1 encontra-se representado o gráfico obtido para o voltamograma cíclico característico do pirrol.

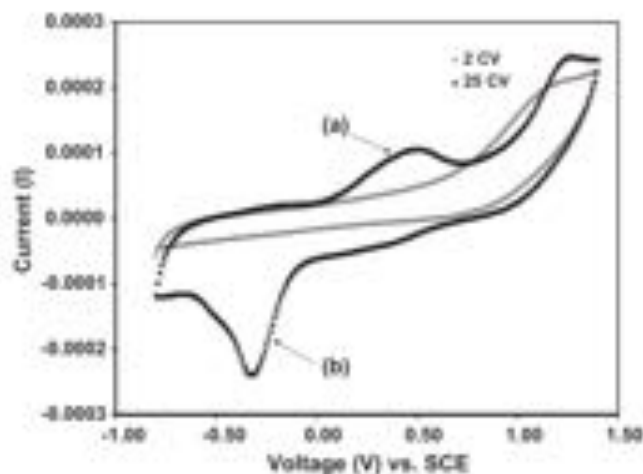


Figura 1.1: Voltamograma cíclico característico para eléctrodos revestidos por polipirrol e dexametasona, evidenciando os picos de oxidação (a) e redução (b). É no segundo pico que o fármaco em questão é libertado do PPy, libertando 92% da dexametasona ao fim de 30 ciclos de VC[18].

Em 2011, X. Luo [19] desenvolveu, também para a dexametasona, um sistema composto por nanotubos de carbono com o fármaco no seu interior e posteriormente polimerizado com PPy. Impondo um estímulo eléctrico contínuo, verificou-se que o fármaco é totalmente libertado dos nanotubos ao fim de 20 horas. Dois anos mais tarde, Esrafilzadeh [20] produziu fibras condutoras multifuncionais para a libertação electronicamente controlada de ciprofloxacina, utilizando um método inovador de electrodeposição em fibras de PEDOT · PSS (poli(3,4-etilenodioxitiofeno) · poliestirenosulfonato) produzidas por *wet-spinning* usando quitosano como agente coagulante. As fibras resultantes, de estrutura híbrida, foram utilizadas como eléctrodo na electropolimerização de uma camada de PPy com ciprofloxacina, condutor electrónico análogo a um interruptor electroquímico que, no estado reduzido liberta o fármaco nele aprisionado. Aplicando ciclos de tensão em VC, estimou-se o valor da sua condutividade em  $56 \pm 7 \text{ S}/\text{cm}$ .

Os resultados dos estudos supramencionados confirmam o potencial de se utilizar polímeros condutores conjuntamente com fibras poliméricas electrofiadas. No entanto, e à semelhança do verificado anteriormente, a libertação do fármaco ainda pode ser optimizada. Tal optimização pode passar pela utilização do conhecimento entretanto adquirido, nomeadamente no que se refere às fibras coaxiais. Assim, aliando as propriedades de degradação e libertação lenta de fibras co-electrofiadas com as características condutoras do polipirrol, é possível desenvolver um sistema mais eficiente no controlo da libertação de componentes activos presentes no interior destas fibras. Desta forma, é objectivo deste trabalho desenvolver estes dispositivos, biocompatíveis e biodegradáveis, que permitam a libertação de substâncias activas e cujo controlo se efectue electronicamente.

## Capítulo 2

# Materiais e Métodos

Neste capítulo, numa primeira parte, abordam-se os materiais que compõem o dispositivo proposto: as matrizes poliméricas de acetato de celulose e os polímeros condutores utilizados para revestir as fibras electrofiadas que, na presença de um estímulo eléctrico, induzirá a libertação do fármaco modelo contido nestas matrizes. Seguidamente, abordar-se-ão os métodos de produção e caracterização utilizados no presente trabalho.

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Matrizes poliméricas

São as matrizes poliméricas, produzidas por electrofiação convencional e coaxial, e que devido à sua resistência, estabilidade, área de superfície e porosidade elevadas, irão proporcionar o suporte ao fármaco e ao polímero condutor. Três características importantes na escolha dos materiais que constituem estas matrizes são: a biocompatibilidade e a capacidade de não alterar a interacção fármaco-tecido.

O polímero, molécula de elevado peso molecular, é formado por uma cadeia longa de elementos repetidos, os monómeros ou unidades repetitivas, covalentemente ligados entre si. O grau de polimerização corresponde ao número de unidades repetitivas existentes na macromolécula.

##### 2.1.1.1 Acetato de celulose

A celulose, por ser proveniente de uma fonte renovável e sustentável, acarretando poucos riscos ambientais, é o polímero mais abundante no planeta Terra. É hidrofílica, quiral e biodegradável [21]. Devido à sua biocompatibilidade, o carboximetil, o nitrato e o acetato de celulose são os derivados de eleição em aplicações médicas.

O acetato de celulose (AC) pode ser resultado de dois processos de acetilação da celulose, homogéneo ou heterogéneo. Nos dois processos forma-se, na presença de um éster de acetato, diacetato e triacetato de celulose. O que os distingue é o solvente que se utiliza e, consequentemente o produto que se forma. No processo heterogéneo (de produção industrial), utiliza-se um solvente onde os cristais

de triacetato são insolúveis, como o tolueno ou o ácido sulfúrico. Neste caso, a celulose é convertida em triacetato de celulose sem que ocorram variações morfológicas nas fibras. No entanto, é o diacetato de celulose o composto com maior valor comercial (maior pureza e mais homogéneo) que, no caso da acetilação heterogénea não se forma. Por outro lado, na acetilação homogénea, na qual se utiliza como solvente o diclorometano, os cristais de triacetato de celulose à medida que se formam vão sendo dissolvidos, resultando numa maior concentração de diacetato de celulose, desde que a concentração de celulose se mantenha elevada. Por fim, o acetato de celulose é obtido a partir da hidrólise do diacetato e do triacetato de celulose [22, 23].

Parâmetros como o grau de acetilação e os solventes fazem variar a sua viscosidade. Escolhendo o solvente adequado é possível electrofiar o acetato de celulose em membranas fibrosas com inúmeras aplicações, particularmente na área dos biomateriais devida à sua biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade a longo-prazo [24]. As matrizes fibrosas de AC são altamente porosas, possuindo elevada área superficial, facilitando a difusão de líquidos no seu interior, daí a sua importância em áreas como a engenharia de tecidos.

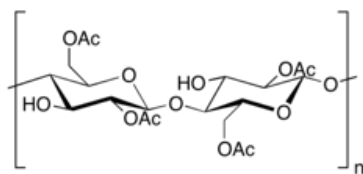


Figura 2.1: Unidade repetitiva do acetato de celulose

### 2.1.2 Electrofição

Num processo de electrofição (*electrospinning*), aplica-se um forte campo electrostático à solução polimérica contida numa seringa, com uma agulha de diâmetro definido. Uma gota de solução polimérica que sai da agulha deforma-se no cone de Taylor pela acção do campo eléctrico. Quando a tensão ultrapassa um certo limite, a força eléctrica torna-se superior à tensão superficial da gota, e um jacto carregado é ejectado da ponta do cone de Taylor. À medida que o jacto "viaja" de encontro ao colector, que se encontra ligado à massa, o solvente evapora e uma membrana com distribuição aleatória de fibras forma-se no alvo [4]. Uma montagem típica deste processo encontra-se esquematizado na Figura 2.2.

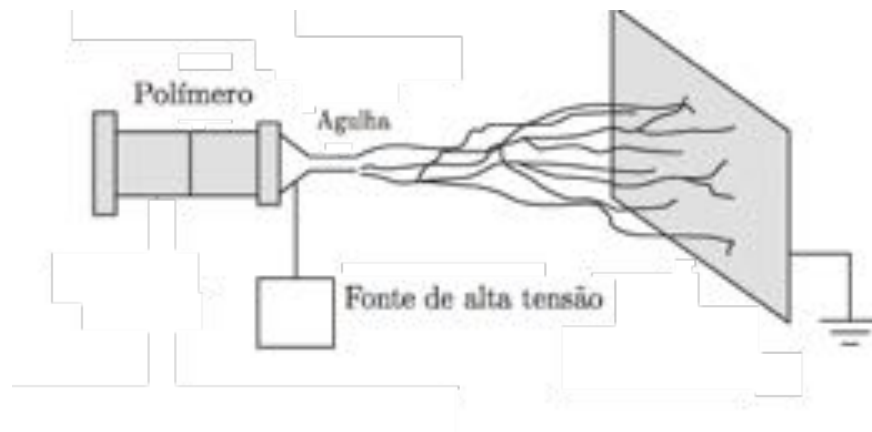


Figura 2.2: Montagem convencional utilizado em electrofiação.

As fibras resultantes deste processo de fiação apresentam diâmetros na escala sub-micrométrica e podem ser utilizadas em inúmeras aplicações, nomeadamente em medicina e em biossensores. Algumas das vantagens de se utilizar este tipo de fibras, assentam no facto do rácio área superficial/volume ser muito grande, apresentarem uma porosidade elevada e de ser possível obter uma grande variedade de geometrias.

A electrofiação coaxial é uma variante da técnica de *electrospinning* com a qual se podem obter fibras com estrutura *core-shell*. O processo de electrofiação coaxial é semelhante ao anteriormente descrito no entanto, em vez de uma agulha, utilizam-se duas agulhas concêntricas pelas quais são ejetadas duas soluções em simultâneo. Para obter fibras com núcleo e bainha diferentes é necessário que as soluções não sejam miscíveis e garantir que até se depositar no colector, o solvente se evapora e as fibras solidificam sem que as duas soluções se misturem [8]. Esta técnica é de especial interesse para inclusão de materiais no interior das fibras (no núcleo), tornando-as multifuncionais. Uma montagem experimental possível para a electrofiação coaxial encontra-se esquematizado na Figura 2.3.

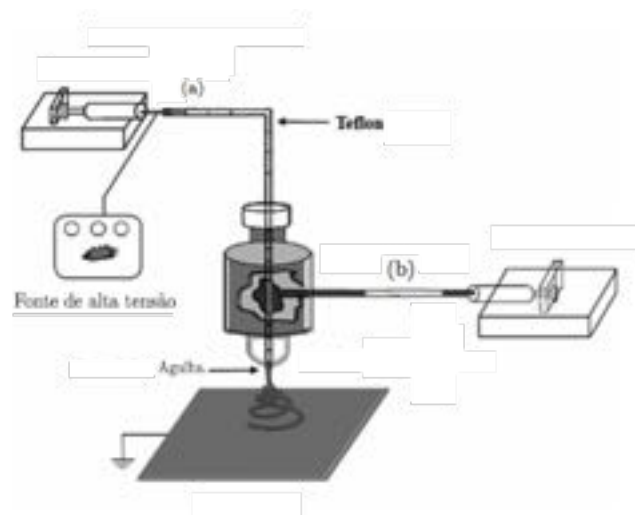


Figura 2.3: Montagem utilizado em electrofiação coaxial. (a) - canal atravessado pelo constituinte do núcleo; (b) - canal atravessado pelo polímero externo (adaptado de He et al. [8]).

### 2.1.2.1 Parâmetros de electrofiação

A qualidade das fibras, a sua morfologia, diâmetros e composição é função dos parâmetros utilizados no processo de electrofiação. A influência dos factores relativos à solução polimérica, os parâmetros do sistema e ambientais, são decisivos na qualidade e morfologia das fibras electrofiadas, e por esta razão devem ser cuidadosamente estudados.

Muitos parâmetros podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras, nomeadamente: (a) as propriedades da solução, como a concentração e viscosidade, a condutividade, e a tensão superficial, (b) variáveis do sistema como a pressão hidrostática e o potencial eléctrico na agulha, e a distância ao alvo (distância entre a ponta da agulha e o colector), e (c) os parâmetros ambientais, tais como a temperatura da solução e da câmara de electrofiação, e a humidade no interior desta.

Das propriedades da solução a electrofiar, a viscosidade é uma das características mais importantes, na medida em que influencia a formação de fibras e a distribuição de diâmetros. Se, por um lado, a viscosidade é demasiado baixa, originam-se pequenas gotas que serão ejectadas para o alvo (juntamente com muitas pequenas fibras de pequeno diâmetro), por outro lado, com viscosidade demasiado elevada, formam-se poucas fibras, mas de grande diâmetro. Para uma dada solução electrofiável existe uma gama de valores óptimos de viscosidade, na qual é possível obterem-se fibras electrofiadas de boa qualidade. A viscosidade da solução é proporcional à concentração de polímero, desta forma, uma concentração mais elevada resulta em diâmetros superiores e *vice-versa*. Adicionalmente, a concentração também afecta a formação de contas e poros na superfície das fibras, sendo a relação inversamente proporcional [25]. No entanto, a porosidade das fibras é mais afectada pelo solvente e pela sua taxa de evaporação.

A tensão superficial depende tanto da composição de solventes presentes na solução polimérica, como da concentração da solução [26]. De um modo geral, quanto menor a tensão superficial do solvente utilizado, mais fácil será a electrofiação que, consequentemente afecta a distribuição de diâmetros das fibras. A condutividade eléctrica da solução é outro factor importante que influencia o jacto. Uma maior densidade de cargas leva a um maior estiramento do jacto, produzindo fibras com menos contas e de diâmetros menores. Uma forma de aumentar a densidade de cargas e portanto a condutividade, é através da adição de sais (como o cloreto de sódio) à solução polimérica [27, 28].

O campo eléctrico, resultante da diferença de potencial entre a ponta da agulha (positivamente carregada) e o colector (ligado à massa), também influencia a distribuição de diâmetros, que tendem a aumentar de forma proporcional com a tensão aplicada. Além disso, o aumento do campo eléctrico também pode induzir uma maior rugosidade das fibras [29], pese embora o solvente, mais precisamente a sua taxa de evaporação e a interação polímero/solvente afecte mais a rugosidade das fibras. Outra variável do sistema, igualmente importante é a distância ao colector. Esta deve ser suficientemente elevada de modo a permitir a evaporação completa do solvente, caso contrário as fibras electrofiadas tendem a colar-se ao colector e entre elas. Mas, por outro lado, um aumento da distância torna o campo eléctrico mais baixo, e nesse caso é necessário aplicar uma tensão muito elevada para garantir o adequado estiramento das gotas formadas na agulha. Outras variáveis do sistema, como o diâmetro da seringa e da agulha, e o caudal a partir do qual se dá a electrofiação do polímero, o seu aumento apenas implicará um aumento da quantidade de solução na ponta da agulha, implicando isso uma limpeza mais frequente das gotas não estiradas.

Por fim, as condições ambientais nas quais se dá o processo de electrofiação, que influenciam a rapidez a que se dá a evaporação do solvente, são: a temperatura da solução que pode alterar a viscosidade, e a humidade.

### 2.1.3 Revestimentos Condutores

Nos polímeros condutores como o polipirrol (PPy) e o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), a condutividade deve-se principalmente ao transporte de cargas ao longo da cadeia polimérica por um mecanismo de percolação entre estados oxidados/reduzidos. Este mecanismo ocorre devido à existência de ligações conjugadas de ligações duplas e simples ao longo da cadeia, cuja energia de ionização dos electrões  $\pi$  é menor, facilitando a ocorrência de reacções redox e a libertação de estados carregados que se movem ao longo da cadeia do polímero.

As propriedades eléctricas deste tipo de polímeros são determinadas pelo grau de oxidação do polímero, influenciado pela forma como se dá a polimerização. Neste trabalho foram estudados processos distintos de polimerização, nomeadamente *in situ* em solução aquosa para o PPy e em câmara de vapores para o PEDOT. Adicionando dopantes a estes polímeros, a sua condutividade aproxima-se da dos metais condutores, uma vez que alteram a carga através da adição ou remoção de electrões, re-organizando a distribuição de cargas em determinados locais da cadeia polimérica.

#### 2.1.3.1 Polipirrol

O PPy é um polímero condutor, biocompatível em humanos e com propriedades fisicomecânicas controláveis. Apresenta alta estabilidade ambiental e térmica, sendo fácil de sintetizar [30, 31]. No entanto, existe uma grande dificuldade em processar o PPy devido à reduzida solubilidade na maioria dos solventes [32], sendo esta a principal desvantagem da sua utilização neste tipo de aplicação. À semelhança do anteriormente mencionado, a condutividade é dependente do dopante utilizado, e no PPy relaciona-se com a quantidade de grupos sulfonato [33, 34]. Actualmente têm sido estudadas aplicações deste polímero em biobaterias, biossensores e sistemas de libertação controlada de fármacos.

O PPy pode ser obtido por duas formas de polimerização do monómero pirrol: química ou electroquímica. Na polimerização química (Figura 2.4), monómeros de pirrol são adicionados a uma solução aquosa com um agente oxidante, como o cloreto de ferro III ( $\text{FeCl}_3$ ) ou o sulfato de ferro ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ). A oxidação do monómero resulta na formação do radical de carga positiva (+2). Esta carga torna-o instável e altamente reactivo, o que pode levar à formação de um dímero neutro. Por sua vez, também este composto é altamente oxidativo, pelo que num mesmo processo forma ligações com outro monómero, originando uma reacção em cadeia de PPy. Na presença do agente oxidante, o PPy permanece no estado oxidado com iões  $\text{Cl}^-$  a dopar a cadeia, proporcionando características condutoras ao polímero [35, 22]. Dependendo do solvente utilizado, da proporção monómero/agente oxidante, da duração da reacção e da temperatura a que se dá, consegue-se controlar a condutividade eléctrica [36].

No segundo tipo de síntese do PPy, a polimerização electroquímica (Figura 2.5), embora semelhante ao caso anterior, aplica-se uma tensão positiva que irá provocar a oxidação e libertação de radicais do pirrol. Uma vez mais, a presença de um dopante resulta na formação de um filme de PPy no estado oxidado.

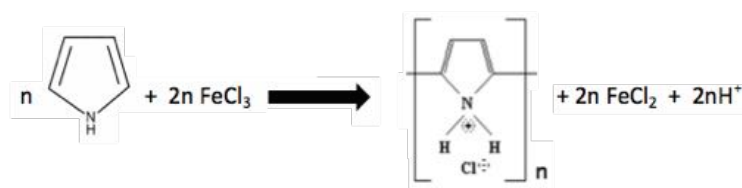


Figura 2.4: Reacção química do polipirrol a partir do pirrol, na presença de cloreto de ferro III como agente catalítico [22].

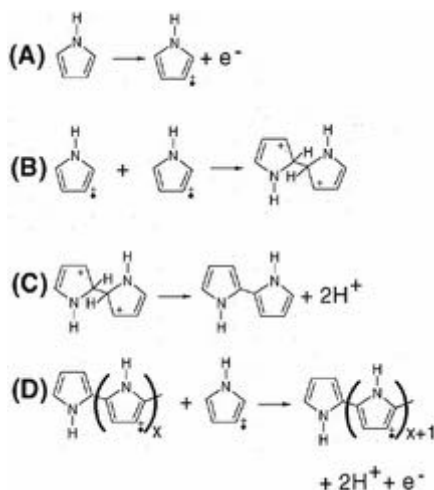


Figura 2.5: Passos para a polimerização electroquímica do pirrol: (A) oxidação do monómero formando um radical, (B) formação de um dímero de pirrol antes da eliminação do hidrogénio, (C) eliminação do hidrogénio e (D) continuação da polimerização do pirrol.

### 2.1.3.2 Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)

O poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) é um polímero condutor com elevada estabilidade, alta condutividade e biocompatibilidade, que tem sido alvo de grande pesquisa por parte da comunidade científica. De entre as inúmeras aplicações, as mais conhecidas são como agente antiestático, componente de condensadores electrolíticos, eléctrodos transparentes em LEDs e, na área da biomédica, como materiais contrácteis para músculos, dopantes de membranas para aplicação em engenharia de tecidos ou em sistemas de libertação controlada de fármacos. Contrariamente ao Ppy, a condutividade do PEDOT é da ordem das centenas de Siemens por centímetro, podendo mesmo chegar aos milhares de Siemens por centímetro (por meio de tratamento térmico) [37].

Existem pelo menos quatro métodos diferentes para produzir revestimentos e filmes de PEDOT: (a) polimerização de fase gasosa, (b) deposição química de vapores, (c) polimerização *in situ* (com adição de polistireno sulfatado (PSS)), e (d) deposição electroquímica [38]. Os primeiros dois métodos, que utilizam vapores de EDOT, produzem revestimentos com condutividades superiores aos outros dois processos [39, 40]. Na polimerização de fase gasosa, apenas é necessário o monómero encontrar-se no estado gasoso, enquanto que na deposição química de vapores, todos os reagentes têm que estar na fase gasosa, além de necessitarem de temperaturas substancialmente superiores. Na polimerização *in situ* e na deposição electroquímica procede-se de forma semelhante às polimerizações do PPy.



#### 2.1.4 Fármaco modelo - Ibuprofeno (IBP)

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico) é um fármaco anti-inflamatório não esteróide derivado do ácido propiónico. Trata-se de um composto opticamente activo, com isómeros S e R, sendo o primeiro biologicamente mais activo. A sua produção dá-se industrialmente a partir da mistura racémica dos dois isómeros anteriores.

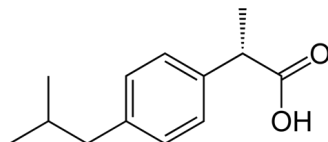


Figura 2.6: Estrutura química do ibuprofeno.

## 2.2 Métodos Experimentais

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram produzidas membranas de fibras poliméricas de AC e fármaco, utilizando duas técnicas de nanofabricação: a electrofiação e a co-electrofiação. Depois de fabricadas as matrizes poliméricas, fizeram-se polimerizações dessas membranas com PPy e PEDOT. Uma vez preparadas, as membranas foram caracterizadas por técnicas de SEM, TEM, voltametria cíclica e espectroscopia UV-visível.

### 2.2.1 Produção das membranas

As membranas poliméricas que constituem o portador do fármaco e o suporte para o posterior revestimento de polímero condutor, conforme anteriormente mencionado, foram produzidas com recurso à técnica de electrofiação (*setup* convencional e coaxial). As membranas de fibras foram revestidas com PPy e PEDOT.

#### 2.2.1.1 Solução polimérica de AC

A solução polimérica contém 12%(wt/v) de acetato de celulose (Sigma-Aldrich, Mw=200,000), dissolvido em acetona (Emsure) e dimetilacetamida (Honeywell Riedel-deHaën), na proporção 2:1, por forma a permitir uma produção contínua de fibras desprovidas de defeitos e irregularidades [22]. A esta solução adicionou-se 30% (relativamente ao peso de AC presente na solução) de ibuprofeno (Farma-Quimica Sur S.L., 99,3% pureza).

#### 2.2.1.2 Electrofiação

Para a produção das membranas, a solução de AC-IBP foi cautelosamente introduzida numa seringa de 1ml de capacidade (B. Braun) por forma a minimizar a existência de bolhas que podem interromper a produção de fibras, e introduziu-se uma agulha de calibre 21G na seringa. Colocou-se a seringa na bomba infusora (KDS100) e introduziram-se os parâmetros - diâmetro da seringa (4,50 mm) e caudal (0,20 ml/h) - que definem a forma como a solução polimérica é ejectada. O colector, ligado à massa e que consiste numa placa metálica revestida por folha de alumínio, foi colocado a uma distância de 15 cm da ponta da agulha. Ligou-se a fonte de tensão (Glassman High Voltage, Inc.), cujo polo positivo se encontra ligado à ponta da agulha. Adicionalmente, um aro metálico ligado também ao polo positivo da fonte de tensão foi posicionado com a agulha ao centro, por forma a uniformizar o campo eléctrico. Desta forma, as fibras distribuem-se preferencialmente dentro deste campo, depositando-se mais no centro do colector.

Durante o processo de electrofiação limpou-se o excesso de solução acumulada na ponta da agulha, em intervalos regulares de tempo, por forma a impedir a formação de defeitos na membrana. Na tabela 2.1 encontram-se especificados os parâmetros utilizados no sistema de electrofiação.

Tabela 2.1: Parâmetros do sistema utilizado para produzir membranas de AC-IBP por electrofiação convencional. Os valores para o diâmetro da seringa e para o caudal foram introduzidos na bomba infusora. A diferença de potencial (ddp) entre a agulha e o colector, à distância especificada, foi gerada por uma fonte de alta tensão. A humidade relativa e a temperatura são parâmetros das condições da câmara onde se realizou a electrofiação.

Diâmetro da seringa [mm]	4,5
Caudal [ml/h]	0,20
Calibre da agulha	21G
Distância ao colector [cm]	15
ddp [kV]	15
Tempo de deposição [h]	2
Humidade relativa [%]	40-50
Temperatura [°C]	20-25

### 2.2.1.3 Electrofiação coaxial

A electrofiação coaxial foi realizada com um sistema de agulhas coaxiais, sendo estas ligadas às seringas por tubos. Uma imagem da montagem experimental encontra-se na Figura 2.7.



Figura 2.7: Montagem do sistema de electrofiação coaxial utilizado. (Em (a), pormenor da agulha utilizada)

Neste processo são necessárias duas bombas infusoras e parâmetros diferentes, por forma a se obter membranas de fibras com estrutura *core-shell*. Para o polímero externo (*out* na Tabela 2.2), encheu-se uma seringa de 2 ml de capacidade (B. Braun) com solução de 12%(wt/v) de AC (sem fármaco), enquanto que para o núcleo (*in* na Tabela 2.2), uma seringa de 1 ml de capacidade (B. Braun) foi carregada com uma solução de 30%(wt/v) de IBP em etanol absoluto (Scharlau S.L., 99,9%(v/v) pureza). Cada uma das seringas foram posicionadas em bombas infusoras distintas (KDS100), definindo-se os parâmetros necessários. O restante processo é similar ao descrito anterior-

mente.

Tabela 2.2: Parâmetros do sistema utilizado para produzir membranas de AC-IBP por electrofiação coaxial. Os valores para os diâmetros das seringas e para os caudais foram introduzidos nas bombas infusoras. A diferença de potencial (ddp) entre o sistema coaxial (Linari Engineering COAX-2DISP) e o colector, à distância especificada, foi gerada por uma fonte de alta tensão. A humidade relativa e a temperatura são parâmetros das condições da câmara onde se realizou o electrospinning.

	<i>Out</i>	<i>In</i>
Solução	AC:acetona:DMAC	IBP:etanol
Diâmetro da seringa [mm]	4,5	10
Caudal [ml/h]	0,35	0,15
Diâmetros OD/ID <sup>(a)</sup> [mm]	1,83/1,37	0,83/0,51
Distância ao colector [cm]	15,0	
ddp [kV]	17,5	
Tempo de deposição [h]	2	
Humidade relativa [%]	40-50	
Temperatura [°C]	20-25	

<sup>(a)</sup> - medidas fornecidas pelo fabricante do sistema coaxial

#### 2.2.1.4 Funcionalização com PPy - oxidação *in situ* em solução aquosa

Preparou-se uma solução aquosa de 0,05 mol/l de pirrol (Sigma-Aldrich, Mw=67,09 g/mol, pureza  $\geq 98\%$ ) e num volume de 20 ml desta solução, adicionou-se uma amostra de membrana que é deixada a agitar por 10 minutos permitindo a impregnação do monómero pirrol. De seguida, e fora do agitador, adicionou-se o agente oxidante - cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ , Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 99,99\%$ ) - na proporção 2:1 ( $\text{FeCl}_3$ :pirrol). Este composto provoca a oxidação dos monómeros, que devido à sua instabilidade, criam ligações entre si, formando cadeias de PPy em torno das fibras das membranas. Passados 45 minutos, as membranas são retiradas das soluções e lavadas com água ultrapura (Millipore®) até não se soltarem mais agregados de PPy. As membranas foram deixadas a secar ao ar, à temperatura ambiente.

#### 2.2.1.5 Funcionalização com PEDOT - polimerização de fase gasosa

O processo de funcionalização das membranas com PEDOT, através da exposição destas a vapores de EDOT, tem por base um trabalho desenvolvido em paralelo com a presente dissertação. Numa primeira etapa, pedaços de membranas fibrosas são mergulhadas numa solução aquosa de 40 g/l de cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ , Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 99,99\%$ ) - o agente oxidante - durante 15 minutos, sendo depois retiradas e deixadas a secar ao ar, à temperatura ambiente. Uma vez secas, as membranas são colocadas em câmaras vedadas com monómero EDOT (Sigma-Aldrich, Mw=142,18 g/mol, pureza 97%) no seu interior. As câmaras são introduzidas numa estufa (Memmert) a 50°C por 2 horas, tendo sido retiradas as membranas de dentro das câmaras passado este tempo. Lavaram-

se com água ultrapura (Millipore®) para retirar o excesso de  $\text{FeCl}_3$  e deixaram-se a secar ao ar, à temperatura ambiente.

### 2.2.2 Técnicas de caracterização morfológica

As matrizes electrofiadas, antes e depois de funcionalizadas com os polímeros condutores, foram sujeitas a técnicas de caracterização de estrutura e morfologia, nomeadamente: SEM e TEM. Realizaram-se testes de libertação em PBS - solução simuladora do meio fisiológico, utilizando a técnica de espectroscopia UV-vis para avaliar o rendimento da libertação do fármaco. Avaliou-se também o comportamento eléctrico por meio de técnicas de voltametria cíclica (VC) e de medidas de condutividade (curvas I-V).

#### 2.2.2.1 SEM

A microscopia electrónica de varrimento é uma técnica que utiliza um feixe de electrões focado na superfície da amostra. Por não estar sujeito ao limite de difracção da luz, como em microscopia óptica, a sua resolução desce até à escala nanométrica, com profundidade de campo elevada, possibilitando a discriminação de estruturas que doutra forma não seriam perceptíveis.

Nesta técnica um feixe de electrões, ao incidir numa determinada amostra, interage com os átomos dessa superfície, ejectando electrões secundários. As amostras são cobertas por uma fina camada de um metal de modo a melhorar a emissão dos electrões secundários, permitindo obter maior resolução de imagem.

**Procedimento** A preparação das amostras inicia-se com o recorte de pequenas porções de membrana, com e sem revestimento, antes e depois das libertações, que são depois coladas por meio de fita condutora de carbono a um suporte metálico adequado. As amostras são então revestidas por uma fina camada de ouro (40-60 nm) e observadas ao microscópio.

#### 2.2.2.2 TEM

Em microscopia electrónica de transmissão, um feixe de electrões de alta energia ( $\approx 200$  keV) interage com uma amostra transparente a electrões ( $\approx 100$  a  $150$  nm de espessura) por forma a estudar a sua composição e microestrutura.

**Procedimento** Primeiro, das membranas electrofiadas pelos método convencional e coaxial, antes e depois dos testes de libertação, com e sem revestimento condutor (PPy e PEDOT), retiram-se fibras individuais que são depois depositadas numa rede de TEM. A rede é então introduzida na câmara do microscópio e observada.

## 2.2.3 Caracterização eléctrica e electroquímica

### 2.2.3.1 Condutividade eléctrica

A condutividade eléctrica foi determinada para todas as membranas produzidas com revestimentos condutores, antes e depois da libertação do fármaco. Foram realizadas curvas corrente-tensão (I-V) de modo a garantir que as amostras possuem um comportamento óhmico, aplicando uma gama de potencial eléctrico às amostras e medindo os respectivos valores de corrente. Pela lei de Ohm ( $V = R \times I$ ) e pela análise das curvas I-V, é possível determinar a resistência, logo a condutividade eléctrica da amostra:

$$\sigma = \frac{l}{A \times R} \quad (2.1)$$

onde  $R$  é a resistência e  $A$  a área da secção transversal da membrana atravessada pela corrente  $I$ , ao longo do comprimento  $l$ .

**Procedimento** Amostras de membrana são recortadas e posicionadas em lâminas de microscópio, fixando as extremidades com cola de prata. Duas pontas de prova de um microprovador (Alessi REL-450) são colocadas nos contactos de prata das amostras. É medido o seu comprimento, largura e espessura, necessário para o cálculo da condutividade. O microprovador encontra-se ligado a um *Semiconductor Parameter Analyser* 4145B controlado por computador (Figura 2.8). Por cada amostra de membrana, adquiriram-se três curvas I-V e calculou-se a média da condutividade. Como parâmetros de medida, introduziram-se os valores da Tabela 2.3.



Figura 2.8: Fotografia do microprovador para registo das curvas I-V das amostras coladas à lâmina.

Tabela 2.3: Parâmetros introduzidos no computador no software de controlo do *Semiconductor Parameter Analyser*, por forma a se obterem as curvas características corrente-tensão (I-V). As medidas das condutividades foram feitas em todas as membranas revestidas (de PPy e PEDOT), antes e depois dos testes de libertação, aos dois tipos de membranas fibrosas produzidas. Por cada amostra adquiriram-se três curvas I-V e foi calculada a média da condutividade.

Número de eléctrodos	2, E1 e E3
Tensão aplicada	E1 - variável; E3 - 0V
Varrimento	Linear
ddp inicial/final	-1V/+1V
Intervalo entre medidas	50 mV
Número de valores medidos	40
Calibração	Auto
Complacência	100 mA

### 2.2.3.2 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica utilizada para obter informações qualitativas sobre os processos electroquímicos de diferentes materiais. A eficiência desta técnica resulta da característica de rapidamente fornecer informações sobre os processo redox, da cinética das reacções de transferência de electrões.

A célula electroquímica onde decorre a VC pode ser constituída por dois ou três eléctrodos: o eléctrodo de trabalho (W), o contra-eléctrodo (CE) e o de referência (Ref.). O contacto eléctrico entre os três eléctrodos ocorre numa solução de concentração elevada de sais, responsável pela alta condutividade do meio. Um voltamograma consiste no registo da corrente em função do potencial aplicado, ou seja,  $I = f(V)$ . No eléctrodo ocorrem várias reacções que se iniciam com a transferência de massa, i.e. a transferência da espécie presente na solução para a superfície do eléctrodo. Posteriormente, ocorre a transferência de electrões na superfície do eléctrodo, denominada de transferência de carga, terminando com as reacções redox que precedem ou sucedem a transferência dos electrões [41].

Nesta técnica começa-se por aplicar um potencial entre W e CE, no qual nenhuma redução ocorre. Variando o potencial aplicado para valores negativos, ocorre a redução do composto em solução, o que gera um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o varrimento é efectuado para tensões positivas (sentido inverso ao anterior), obtêm-se as reacções de oxidação. Se o sistema redox permanecer em equilíbrio durante o varrimento de potencial, classifica-se o processo como reversível [42]. Os picos de potencial ( $E_p$ ) e os picos de corrente ( $i_p$ ) encontram-se representados na Figura 2.9.

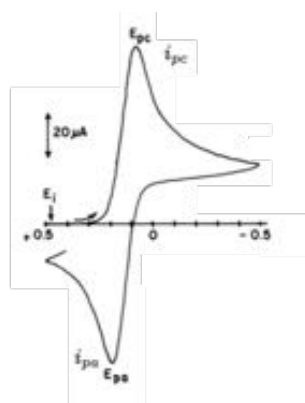


Figura 2.9: Exemplo de voltamograma cíclico (adaptado de [42]).

**Procedimento** As membranas de AC:IBP revestidas por polímero condutor e obtidas pelos dois métodos de electrofiação, com cerca de  $1 \text{ cm}^2$  de área, foram fixas no crocodilo do eléctrodo de trabalho e mergulhadas em 20 ml de meio PBS a 2 cm de distância de um fio de prata (CE).

A caracterização electroquímica do dispositivo foi feita num potenciostato *Gamry Instruments (Reference 3000)*. A configuração escolhida foi a de dois eléctrodos, ou seja o CE ligou-se à Ref., sendo o potencial medido entre este conjunto e W.

No software controlador do potenciostato *Gamry Instruments* utilizou-se a aplicação *Cyclic Voltammetry*. Os parâmetros de varrimento adoptados foram:

- Gama de varrimento:  $-1.5 \text{ V}$  a  $+1.5 \text{ V}$ ;
- Velocidade de varrimento:  $100 \text{ mV/s}$ ;
- Número de ciclos: 30;
- Corrente máxima:  $10 \text{ mA}$ .

#### 2.2.4 Testes de libertação do fármaco

Para simular a libertação do fármaco encapsulado nas fibras electrofiadas e revestidas por polímero condutor, realizaram-se vários ensaios em *Phosphate Buffer Solution* (PBS) uma vez que simula as condições de fisiológicas. As membranas mergulhadas neste meio foram sujeitas a estímulos eléctricos de várias amplitudes. A estimativa da quantidade de IBP libertado pelas fibras para o PBS foi realizada por espectroscopia UV-vis. Para tal, foi necessário um estudo inicial da variação da absorvância para diferentes concentrações de IBP dissolvido em PBS, permitindo a construção de uma curva de calibração, usada posteriormente para relacionar a concentração de IBP libertado pelas membranas nos testes descritos.

Para este estudo foram testadas membranas produzidas por electrofiação (*setup* convencional e coaxial) contendo 30% de fármaco encapsulado, funcionalizadas com PPy ou PEDOT. Fizeram-se três repetições de cada ensaio.



### 2.2.4.1 PBS

A solução de PBS é uma solução aquosa composta por sais e com pH 7.4, que simula a composição iónica do corpo humano, sendo por este motivo uma solução muito utilizada em estudos biológicos.

Começou-se por preparar uma solução *stock* (10× concentrada) contendo as massas de sais dissolvidos em água ultrapura (Millipore) constantes na Tabela 2.4. Para a solução final, basta diluir a solução *stock* em água ultrapura (Millipore) na proporção 1:10, respectivamente.

Tabela 2.4: Sais utilizados na preparação da solução *stock* (10×) de PBS.

Sal	Marca	Massa adicionada [g]
NaCl	Baker, M = 58,44 g/mol	40,0
KCl	Sigma-Aldrich, M = 74,55 g/mol	1,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, M = 141,96 g/mol	7,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, M = 136,09 g/mol	1,2

### 2.2.4.2 Espectroscopia UV-vis

A técnica de espectroscopia UV-vis permite a obtenção de espectros de absorvância e transmitância de um dado material. O espectro obtido relaciona-se com a interação desse material com a energia do feixe incidente na amostra. No espectrometro, radiação electromagnética atravessa uma amostra contida numa célula (*cuvette*) de 1cm de comprimento. Radiação no intervalo de comprimentos de onda de interesse é lida ao mesmo tempo que radiação com a mesma frequência e intensidade atravessa a célula de referência apenas contendo o solvente. O fotómetro detecta a radiação transmitida e o espectrometro, que comparando a intensidade de radiação que atravessa a amostra com a célula de referência, regista a absorção. Como o vidro comum absorve radiação a partir de 365nm, e o *Pyrex* absorve a partir de 320nm, para um espectrofotometro que opere nestes c.d.o., devem ser utilizadas *cuvettes* de sílica pura.

A lei de Beer dita que a absorção é proporcional ao número de moléculas absorvedoras, i.e. proporcional à concentração de moléculas absorvedoras (apenas aplicável a soluções diluídas), e a lei de Lambert define que a fracção de radiação absorvida é independente da intensidade da radiação. Combinando estas duas leis pode-se derivar a lei de Beer-Lambert:

$$\text{Log}_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon l C \quad (2.2)$$

com:

$I_0$  = intensidade da radiação incidente;

$I$  = intensidade da radiação transmitida;

$\varepsilon$  = constante de absorção molar (ou coeficiente de extinção molar)  
[mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>];

$l$  = comprimento do percurso de luz que atravessa a solução [cm];

$C$  = concentração de espécies absorvedoras [mol dm<sup>-3</sup>].

O valor de  $\text{Log}_{10}(\frac{I_0}{I})$  representa a absorvância da solução, retirada directamente do espectro de absorvância.

O equipamento disponível (PG Instruments Ltd., T90+ UV/VIS Spectrometer) possui uma gama de comprimento de onda de 190 nm a 900 nm e é controlado por computador via software (UVWin Spectrometer Software, Ver. 5.2.0.).

No início de cada ensaio, duas *cuvettes* de quartzo contendo PBS são posicionadas nas duas *slots* para a correcção da *baseline* (possibilita a eliminação do espectro do meio), deixando-se a *cuvette* da referência na *slot* devida. Durante o teste de libertação, são colocados 3 ml de amostra numa *cuvette*, obtendo-se o espectro de absorção para o intervalo 200 - 350 nm, por ser nesta gama que se encontra o pico de absorção do IBP.

#### 2.2.4.3 Espectro de referência do IBP

Para se relacionar a variação da concentração de IBP no meio PBS, libertado pelas fibras, foi necessário um estudo inicial da variação da absorvância para diferentes concentrações conhecidas de IBP dissolvido em PBS. Desta forma, adquiriram-se os espectros para várias diluições sucessivas deste fármaco em PBS.

Começou por se preparar uma solução *stock* de 1680 µg/ml de IBP em PBS. Por diluições sucessivas desta solução, obtiveram-se soluções com as concentrações constantes na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Soluções padrão preparadas para a curva de calibração IBP/PBS.

Concentração de IBP em PBS [µg/ml]						
1680,0	55,0	36,7	24,4	16,3	10,9	7,2

#### 2.2.4.4 Testes de libertação em PBS

Num copo contendo 20 ml de PBS, foi mergulhada uma membrana contendo fármaco e com um revestimento de um polímero condutor (PPy ou PEDOT), estabeleceu-se o contacto eléctrico com o polo positivo da fonte de tensão (Keithley 237 High Voltage Source Measure Unit) sendo o polo negativo ligado a um eléctrodo de prata (Figura 2.10). É importante manter a distância entre a membrana e o eléctrodo de prata (aproximadamente 2 cm) para todos os ensaios, de modo a minimizar o erro. Aplicaram-se pulsos eléctricos de duração conhecida.

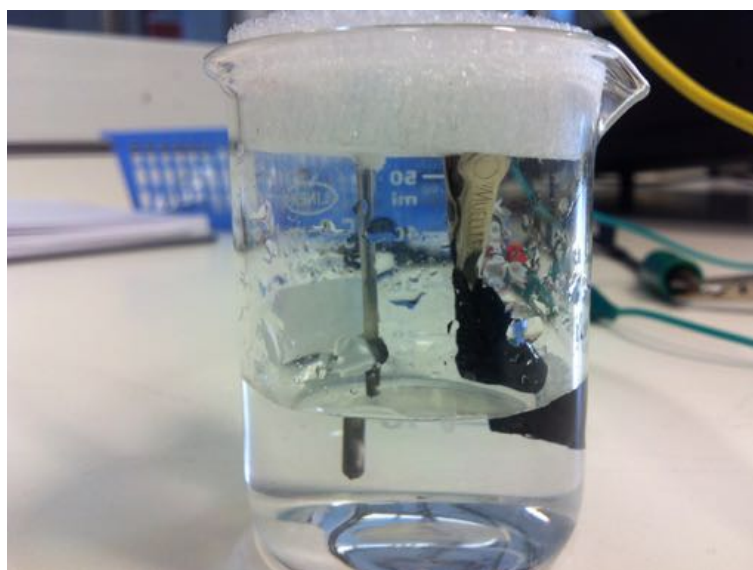


Figura 2.10: Montagem experimental adoptada para os testes de libertação de IBP em PBS. À esquerda, contra-eléctrodo de prata; à direita, membrana a testar.

Por forma a minimizar flutuações de condutividade e quantidade de fármaco encapsulado, foram utilizadas amostras com aproximadamente a mesma massa ( $\approx 5,5 \pm 0,1$  mg após polimerização) e provenientes da mesma membrana. Cada amostra foi testada em meio PBS novo, por ensaio. Fizeram-se três ensaios, para uma dada tensão e intervalo de aplicação do pulso, por forma a se obter uma estatística razoável que permita analisar a reprodutibilidade e viabilidade dos ensaios efectuados.

Ao fim de cada pulso eléctrico, os eléctrodos (inclusivamente a membrana) são retirados do PBS, e é obtido o espectro de absorvância do meio. Após a aquisição do espectro, o meio retirado regressa ao copo, recolocam-se os eléctrodos, e restabelece-se a ligação com a fonte de tensão.

Na Tabela 2.6 encontram-se discriminados os diferentes testes realizados. No primeiro ensaio descrito, não se aplicou nenhuma diferença de potencial por forma a se estudar o transporte passivo do IBP para o meio. Nos restantes ensaios aplicaram-se os pulsos mencionados, para estudar o transporte em condições estimuladas.

Tabela 2.6: Discriminação dos testes de libertação de fármaco realizados às membranas produzidas.

	Difusão passiva <sup>(a)</sup>	0 V <sup>(a)</sup>	+0,15 V <sup>(b)</sup>	+0,50 V <sup>(b)</sup>	+1,00 V <sup>(b)</sup>
mAC:IBP/PPy	✓	✓	✓	✓	✓
cAC:IBP/PPy	✓	✓	✓	✓	✓
mAC:IBP/PEDOT		✓			

<sup>(a)</sup> - durante os primeiros 45 minutos do ensaio, por cada minuto, obteve-se um espectro UV-vis. Posteriormente, obtiveram-se os espectros em intervalos de 10 minutos.

<sup>(b)</sup> - durante os primeiros 50 minutos do ensaio aplicaram-se estímulos com duração de 5 minutos, seguindo-se de estímulos de 15 minutos até terminar o teste.



## Capítulo 3

# Apresentação e discussão dos resultados

No presente capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Em primeiro lugar, apresenta-se a morfologia das membranas produzidas por electrofiação (*setup* convencional e *setup* coaxial) e funcionalizadas com dois polímeros condutores distintos (PPy e PEDOT). São apresentados os testes de libertação de fármaco e discutidos os ensaios de caracterização eléctrica, nomeadamente a condutividade e a voltametria cíclica.

### 3.1 Análise morfológica

As membranas electrofiadas pelos métodos descritos e revestidas com polímeros condutores (PPy e PEDOT), foram avaliadas quanto à sua morfologia antes e depois dos testes de libertação do fármaco, através das técnicas de SEM e TEM. Os diâmetros médios das fibras foram estimados utilizando o programa de processamento de imagem *ImageJ*®, tendo sido recolhidos um total de 100 amostras por membrana para o seu cálculo, excepto para a amostra de membrana revestida por PEDOT.

#### 3.1.1 Membranas de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas por PPy

As membranas de fibras, produzidas a partir da electrofiação de uma solução de AC:IBP (Secção 2.2.1) e utilizando o método de electrofiação nas condições descritas, foram revestidas através da polimerização *in situ* do pirrol, para as tornar condutoras e simultaneamente flexíveis (mAC:IBP/PPy). Neste tipo de funcionalização, a polimerização do monómero pirrol ocorre em solução aquosa por acção do  $FeCl_3$  (III).

Nas Figuras 3.1 e 3.2 encontram-se, respectivamente, as imagens de SEM obtidas para a mesma membrana produzida por electrofiação, antes e depois da libertação do fármaco contido no seu interior.

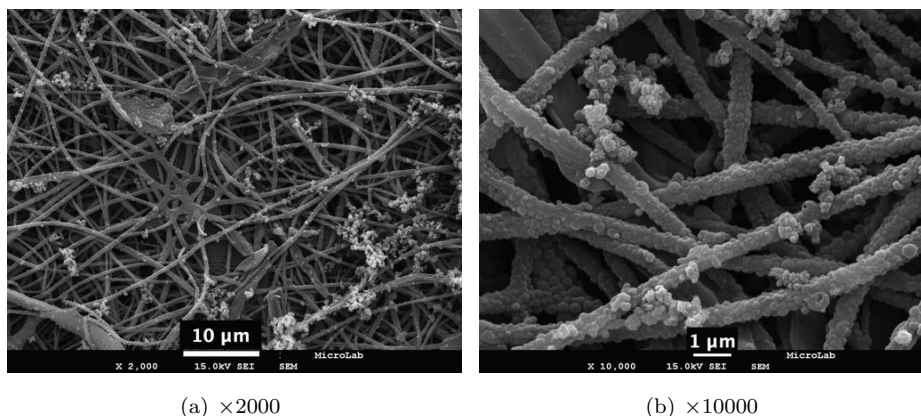
(a)  $\times 2000$ (b)  $\times 10000$ 

Figura 3.1: Imagens de SEM das membranas mAC:IBP/PPy, antes do teste de libertação do fármaco. Duas ampliações distintas ((a) e (b)) são apresentadas para a mesma amostra. As fibras apresentam diâmetro médio de  $563 \pm 194$  nm, valor estimado através 100 amostras recolhidas utilizando para este propósito o programa de processamento de imagem *ImageJ*®.

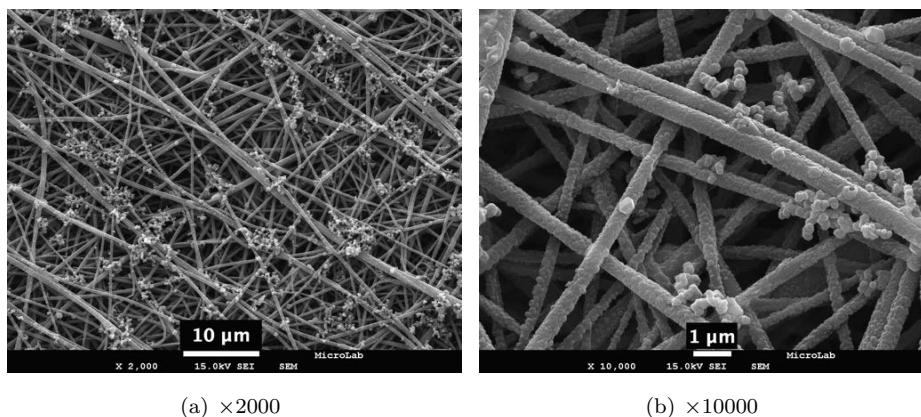
(a)  $\times 2000$ (b)  $\times 10000$ 

Figura 3.2: Imagens de SEM das membranas mAC:IBP/PPy, após o teste de libertação do fármaco em meio PBS (pH 7.4), por um período de 45 minutos, sem aplicação de estimulação eléctrica, tendo sido retirada a membrana da solução e deixada a secar terminado o tempo de libertação. Duas ampliações distintas ((a) e (b)) são apresentadas para a mesma amostra. As fibras apresentam diâmetro médio de  $456 \pm 146$  nm, valor estimado a partir de 100 amostras recolhidas utilizando para este propósito o programa de processamento de imagem *ImageJ*®.

Analisando as Figuras 3.1 e 3.2, é possível verificar a deposição do PPy ao longo de toda a superfície das fibras, observando-se inclusivamente a existência de aglomerados deste polímero. Estes aglomerados podem ser resultado da lavagem incompleta das membranas aquando da sua funcionalização, ou mesmo como resultado de um período de polimerização demasiado extenso [22]. Comparando as mesmas figuras, conclui-se que depois do teste de libertação, a membrana da Figura 3.2 apresenta menos aglomerados de PPy, sendo também possível observar uma perda de parte do seu revestimento, resultado que poderá validar a perda da condutividade das membranas após a libertação do IBP (mais à frente, na Secção 3.3.1). De facto, é evidente uma diminuição notória no diâmetro médio das fibras com o teste de libertação. Inicialmente, as fibras possuem  $563 \pm 194$  nm de diâmetro

diminuindo para  $456 \pm 146$  nm após a libertação do fármaco do seu interior, representando uma perda de aproximadamente 20% relativamente aos valores iniciais. Uma vez que o diâmetro médio das fibras antes do revestimento é de cerca de 480 nm [22], é possível estimar a espessura da camada de PPy formada ( $\approx 42$  nm).

Adicionalmente, também se observam imperfeições nas fibras electrofiadas (Figura 3.1(a)) nomeadamente bandas de AC:IBP/PPy no lugar de fibras. Estas imperfeições podem ser devidas, por um lado, a flutuações das variáveis ambientais durante o processo de electrofiação ou, por outro, devido ao processo de revestimento das membranas.

### 3.1.2 Membranas de fibras coaxiais de AC(out):IBP(in) revestidas por PPy

As membranas de fibras coaxiais foram produzidas através da técnica de electrofiação coaxial (secção 2.2.1) a partir de uma solução de AC em acetona e DMAc, para o polímero externo da fibra, e de uma solução de IBP em etanol, para o núcleo da fibra (cAC:IBP). Foi realizado um estudo da morfologia das fibras coaxiais antes e depois dos testes de libertação e da funcionalização da membrana por PPy (cAC:IBP/PPy). Neste tipo de funcionalização, ocorre a oxidação do monómero pirrol à superfície das fibras de AC:IBP na presença do agente oxidante  $FeCl_3$  (III) (polimerização *in situ* em solução aquosa).

Nas Figuras 3.3 e 3.4 encontram-se respectivamente, imagens da secção das fibras obtidas por SEM e imagens de transmissão obtidas por TEM, antes da funcionalização com PPy. Nas Figuras 3.5 e 3.6 encontram-se imagens de SEM da secção da membrana de fibras coaxiais de AC:IBP e imagens de TEM de fibras da mesma membrana, depois da funcionalização com PPy e antes da libertação do fármaco, respectivamente. Na mesma figura (Figura 3.6(c), (d), (e) e (f)) encontram-se as mesmas fibras coaxiais, revestidas com polímero condutor, depois de realizada a libertação do fármaco.

Na Figura 3.3(a), apesar de não ser evidente a existência de uma estrutura coaxial da secção da fibra, é possível observar-se uma ligeira diferença entre o seu exterior e interior, que se reflete na diferença das rugosidades. Uma vez que a solução que constitui o núcleo da fibra se trata de IBP dissolvido em etanol, que não sendo solvente do AC mas miscível com a acetona e com o DMAc, este poderá ter difundido pela bainha de AC, não evidenciando desta forma a estrutura coaxial desejada. De qualquer forma, caso tenha ocorrido ou não a difusão da solução de IBP pelo AC, certamente que a concentração de fármaco no núcleo da fibra coaxial será superior à da periferia. Na Figura 3.3(b), observam-se duas fibras de menor calibre fundidas numa fibra de calibre superior. De facto, como o método de electrofiação coaxial adoptado não é o optimizado, existem várias possibilidades para esta deformação ocorrer nas membranas. Por um lado, a distância entre a agulha e o colector poderá não ser a adequada para possibilitar a evaporação completa do solvente, resultando assim na fusão de fibras. Também flutuações nas condições ambientais no interior da câmara de electrofiação podem evitar a evaporação do solvente. Por outro lado, a existência de diversos solventes (acetona, DMAc e etanol) em excesso e a incompatibilidade do etanol com o AC também podem estar na origem destes defeitos.

Na Figura 3.4 encontram-se imagens obtidas por TEM para as mesmas fibras coaxiais não funcionalizadas com polímero condutor. Esperar-se-ia encontrar uma estrutura coaxial, com separação evidente entre o núcleo de IBP e a bainha de AC. No entanto, apenas as fronteiras do polímero exterior

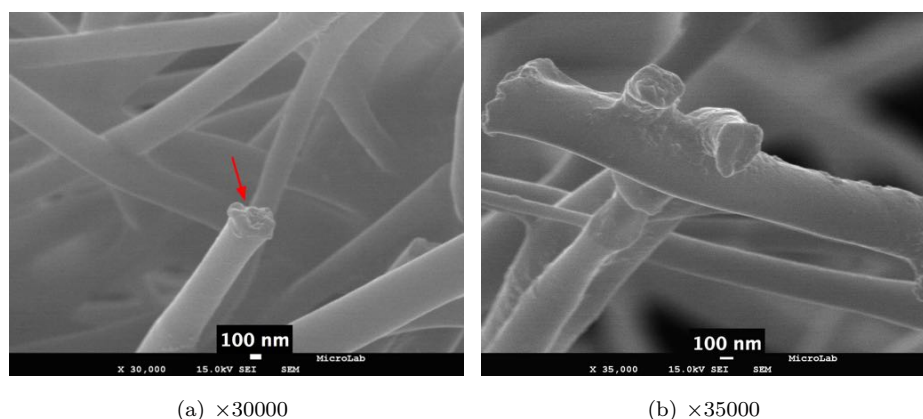


Figura 3.3: Imagens obtidas por SEM da secção das membranas de fibras coaxiais cAC:IBP sem revestimento condutor. São apresentadas duas imagens de duas regiões distintas da mesma membrana, em duas ampliações diferentes ((a) e (b)). Foram calculados, através do programa de processamento de imagem *ImageJ*®, os diâmetros externos médios, tendo-se obtido  $373 \pm 79$  nm.

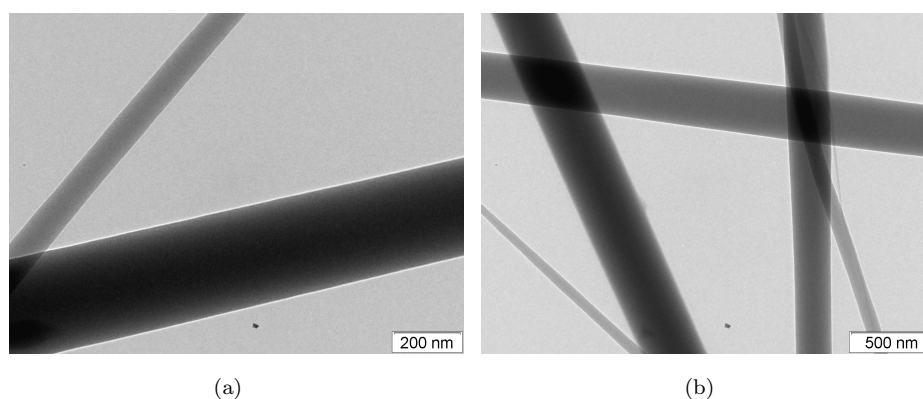


Figura 3.4: Imagens de TEM de fibras coaxiais cAC:IBP sem revestimento condutor. São apresentadas duas micrografias de duas regiões distintas da mesma fibra, em duas ampliações diferentes. Tanto em (a) como em (b) não é visível uma estrutura *core – shell*, sendo apenas visível as fronteiras externas das fibras.

são visíveis. Tal pode dever-se à difusão da solução de IBP pelo AC como referido anteriormente.

Relativamente aos diâmetros estimados, as fibras coaxiais não revestidas possuem diâmetro externo médio de 373 nm que, comparativamente ao diâmetro das fibras de acetato de celulose eletrofiadas pelo método convencional (480 nm), é inferior em cerca de 20% relativamente às últimas. Uma causa para esta diminuição poderá ser a existência de um solvente extra, o etanol da solução nuclear, que poderá diminuir a viscosidade, logo a diminuição do diâmetro das fibras devido a um maior estiramento das gotas de solução.



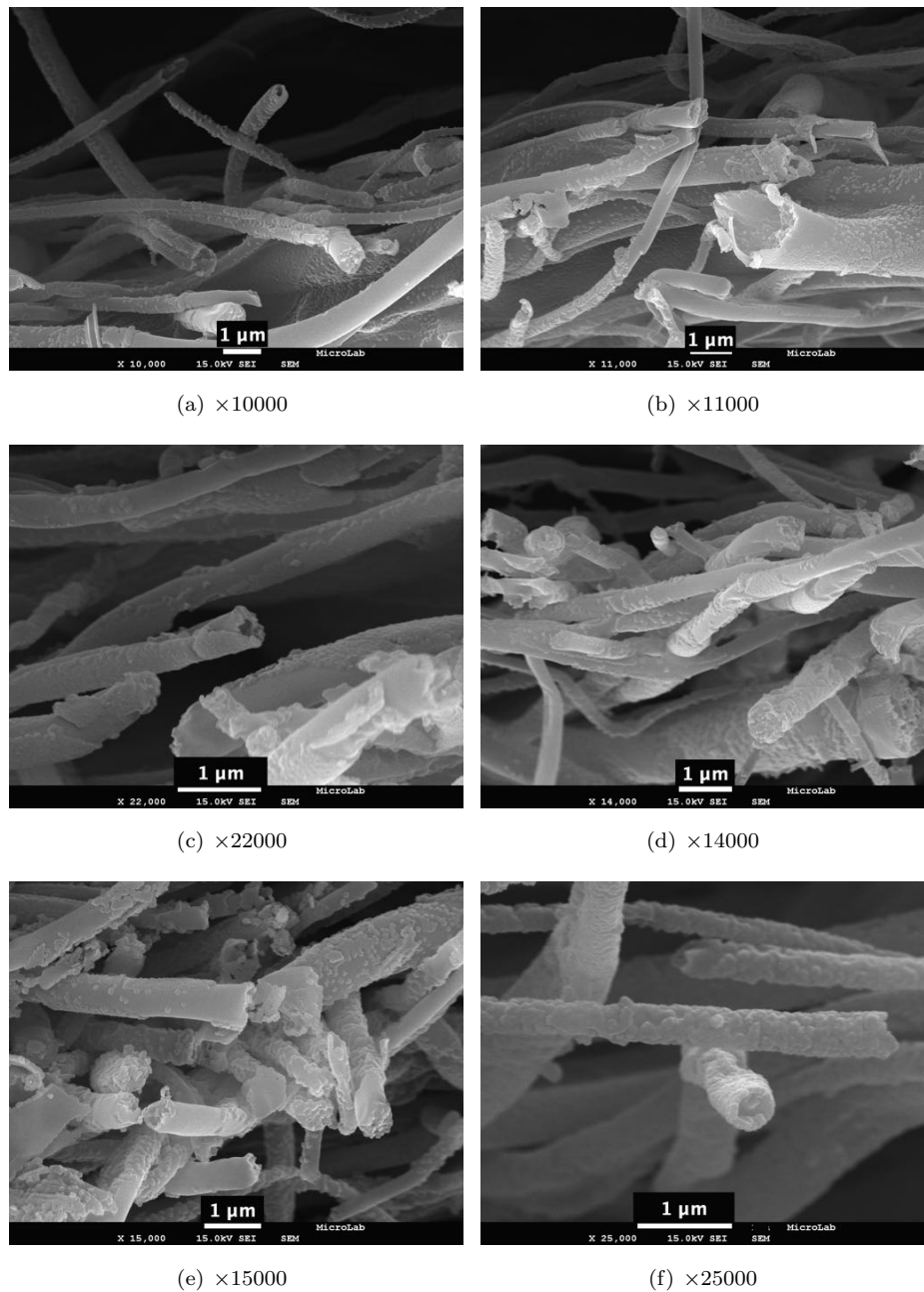


Figura 3.5: Imagens de SEM da secção das membranas de fibras coaxiais cAC:IBP/PPy. São apresentadas seis imagens ((a) a (f)) de diferentes regiões da mesma membrana, em ampliações distintas. Os diâmetros médios internos e externos destas fibras são de  $298 \pm 25$  nm e de  $486 \pm 31$  nm, respectivamente.

No conjunto de imagens da Figura 3.5 é possível observar um corte transversal das fibras coaxiais e funcionalizadas com PPy, sendo aparente uma estrutura *core – shell* em (a), (b), (c) e (f). É também visível o polímero condutor ao longo das fibras, apesar de não uniforme. Esta não uniformidade advém do facto das membranas possuírem maior densidade de fibras por unidade de volume, logo menor tamanho do poro, que no caso das produzidas pelo método convencional, já que as primeiras possuem diâmetros 20% menores que as últimas, impedindo a impregnação total da

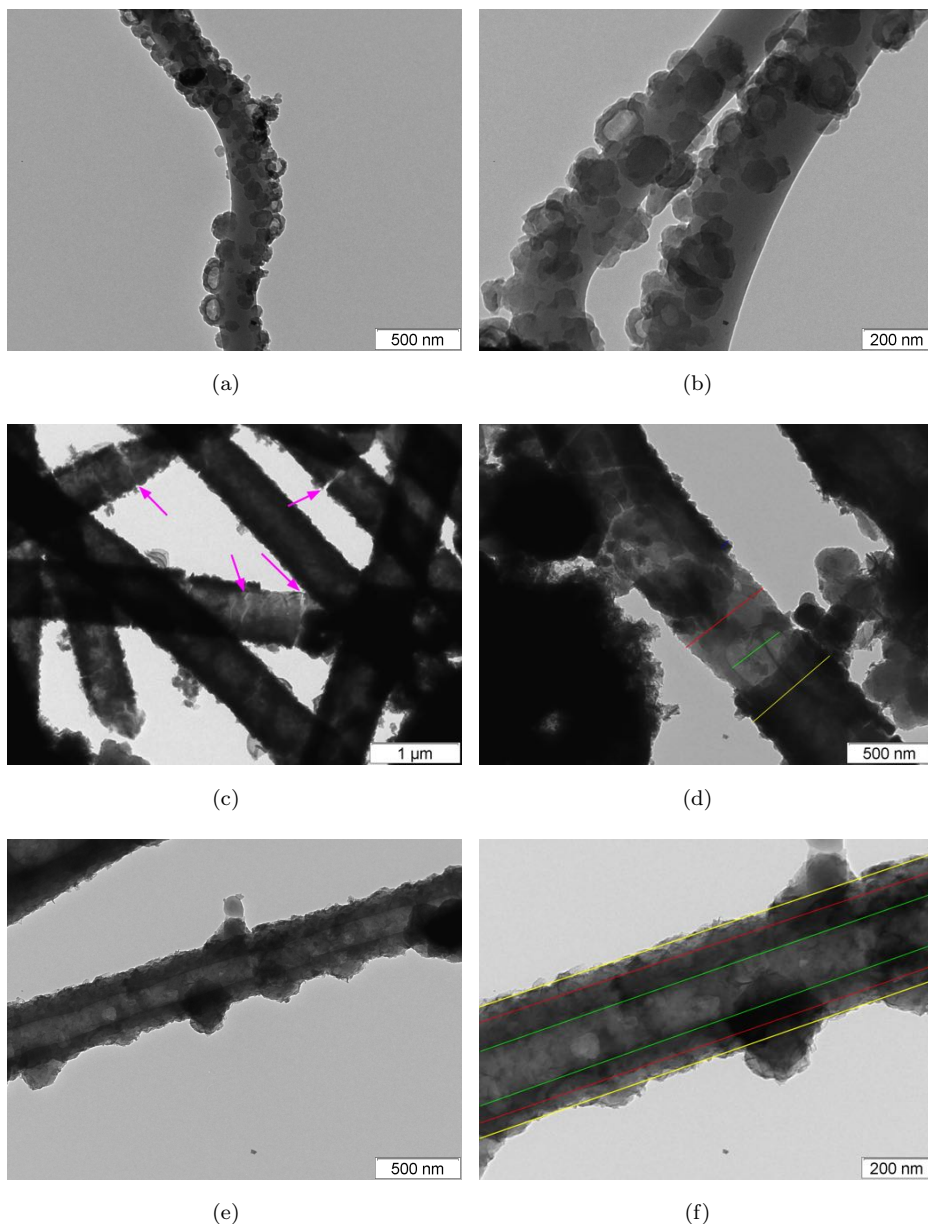


Figura 3.6: Imagens de TEM de fibras coaxiais cAC:IBP/PPy, antes ((a), (b)) e depois ((c), (d), (e), (f)) do ensaio de libertação. Em (c) encontram-se assinaladas fracturações das fibras causadas no teste de libertação e em (d) e (f), as fronteiras da estrutura coaxial: verde para o núcleo oco, encarnado para o AC e amarelo para o PPy. Os diâmetros médios estimados para as últimas quatro imagens são de:  $\phi_{PPy} = 469 \pm 162$  nm,  $\phi_{AC} = 379 \pm 190$  nm e  $\phi_{in} = 268 \pm 116$  nm.

membrana na solução aquosa de polimerização.

Na Figura 3.6(a) e (b) encontram-se imagens TEM de fibras coaxiais revestidas de PPy antes da libertação do ibuprofeno. À semelhança do que sucede na Figura 3.4, não é evidente uma estrutura coaxial. Note-se, no entanto, a existência do revestimento de PPy na forma de grânulos contendo (possivelmente) fármaco no seu interior. Estes podem ser resultado do método de funcionalização das

membranas, que para o caso do PPy se efectua em solução aquosa durante cerca de 1 hora. Por outro lado, após a libertação do fármaco do interior da fibras, é evidente a existência de uma morfologia coaxial (em 3.6(e) e (f)), característica de estruturas ocas, sugerindo que o IBP abandona o núcleo da fibra. É também interessante verificar o estado em que ficam as membranas cAC:IBP/PPy após a libertação do IBP (em 3.6(c) e (d)), sugerindo a fragilidade deste tipo de fibras, que devido à libertação do fármaco se formaram vazios e consequentemente tornaram as fibras menos resistentes. Pode observar-se a não uniformidade do polímero condutor ao longo da fibra e uma aparente diminuição deste após a libertação do fármaco. Também os grânulos (contendo possivelmente o fármaco) observados nas fibras antes da libertação desapareceram depois dos ensaios de libertação.

Os diâmetros estimados para as fibras revestidas, 486 nm para o externo e 298 nm para o interno, permitem estimar a espessura de PPy formada com o processo de funcionalização - 94 nm de espessura. Apesar da polimerização do revestimento de PPy nas fibras coaxiais não ser o optimizado, a espessura das últimas é superior à das fibras obtidas pelo método convencional (42 nm).

A estimativa dos diâmetros externo ( $\phi_{PPy} = 486 \pm 31$  nm) e interno ( $\phi_{AC} = 298 \pm 25$  nm) para as fibras revestidas da Figura 3.5 encontram-se em concordância com os estimados em 3.6(c), (d), (e) e (f) ( $\phi_{PPy} = 469 \pm 162$  nm,  $\phi_{AC} = 379 \pm 190$  nm), comprovando-se a existência de uma estrutura coaxial, com diâmetro médio do núcleo oco das fibras depois do ensaio de libertação:  $\phi_{in} = 268 \pm 116$  nm.

### 3.1.3 Membranas de fibras electrofiadas de AC:IBP revestidas por PEDOT

Produziram-se membranas, através da técnica de electrofiação convencional (secção 2.2.1), a partir de uma solução de AC:IBP em acetona e DMAc. Posteriormente as fibras foram funcionalizadas com polímero condutor PEDOT (mAC:IBP/PEDOT). Este tipo de funcionalização ocorre expondo uma membrana, que contém o agente oxidante  $FeCl_3$  (III), aos vapores do monómero EDOT. Foi realizado um estudo morfológico das fibras mAC:IBP/PEDOT antes e depois dos testes de libertação.

Na Figura 3.7 encontram-se as imagens obtidas por TEM para as membranas mAC:IBP/PEDOT (a) antes e (b) depois da libertação do fármaco do seu interior. Verifica-se uma deposição uniforme de polímero condutor ao longo de toda a fibra e, contrariamente ao sucedido na Figura 3.6, não existem aglomerados. A forma como PEDOT se distribui ao longo da fibra é mais uniforme e aparentemente mais homogénea do que as fibras revestidas com PPy. Isto deve-se ao facto da polimerização do PEDOT se dar em fase gasosa, mergulhando-se a membrana apenas por 15 minutos para a impregnação do agente oxidante nas fibras, em contraste com a funcionalização com PPy, que se dá durante mais de 1 hora em solução aquosa. Esta diferença na permanência das membranas em solução aquosa faz com que o fármaco que sai da membrana por difusão, seja superior naquelas imersas durante mais tempo. O diâmetro médio estimado para as fibras revestidas de PEDOT é de aproximadamente 473 nm, valor menor que para o caso das mesmas fibras revestidas de PPy (563 nm). Uma vez que fibras deste tipo sem revestimento possuem diâmetro médio de 480 nm, e que neste caso as revestidas por PEDOT têm aproximadamente diâmetro menor mas muito próximos, conclui-se que o revestimento de PEDOT é surpreendente menor em espessura que o de PPy, não sendo possível estimar o seu valor médio. Após a libertação do fármaco (em 3.7(b)), verifica-se que o PEDOT é degradado de forma semelhante à degradação observada nos revestimentos de PPy.

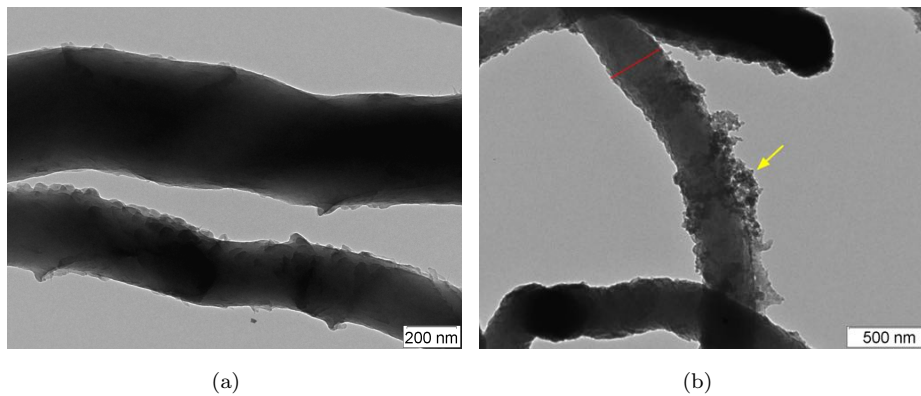


Figura 3.7: Imagem de TEM de fibras electrofiadas mAC:IBP/PEDOT (a) antes e (b) depois da libertação do fármaco. Através do programa de processamento de imagem *ImageJ*® calculou-se um diâmetro médio de 473 nm para a fibra de maior calibre. Em (b), encontra-se assinalado pela seta a amarelo, o PEDOT solto à superfície da fibra.

### 3.2 Libertação do fármaco em PBS

Foram realizados vários testes de libertação do fármaco por forma a avaliar o desempenho das membranas desenvolvidas. Encapsulou-se uma concentração conhecida de IBP no interior de fibras obtidas por electrofiação (montagem convencional e coaxial). Posteriormente, revestiram-se as membranas com dois polímeros condutores: PPy e PEDOT, cujos protocolos se encontram descritos na secção ???. Por forma a simular o comportamento do dispositivo em condições fisiológicas, em todos os ensaios, utilizou-se meio PBS. A concentração de fármaco libertada para a solução foi quantificada tendo por base a curva de calibração obtida através dos espectros de absorvância.

Trabalhos realizados anteriormente [22] e em paralelo com esta dissertação, permitiram definir valores prévios como a duração, o sinal e a amplitude do estímulo eléctrico, para membranas obtidas por electrofiação convencional, funcionalizadas com PPy, para diferentes concentrações de fármaco. Desta forma, as membranas produzidas por electrofiação convencional e funcionalizadas com polipirrol (mAC:IBP/PPy) serviram de meio de comparação face aos resultados obtidos para as fibras coaxiais revestidas pelo mesmo polímero condutor (cAC:IBP/PPy), sendo estas o cerne da inovação proposta. Adicionalmente, um novo revestimento, desenvolvido paralelamente no laboratório, foi testado nos dois tipos de fibras. No entanto, como o método de funcionalização com este polímero não é o optimizado para fibras coaxiais, daqui resultaram membranas pouco revestidas e demasiadamente frágeis, impossibilitando a realização dos ensaios de libertação. Ou seja, apenas se realizaram testes de libertação às fibras mAC:IBP/PEDOT.

### 3.2.1 Curva de calibração do IBP em PBS

Na Figura 3.8 (a), encontram-se os espectros de absorvância para sete concentrações de IBP em PBS.

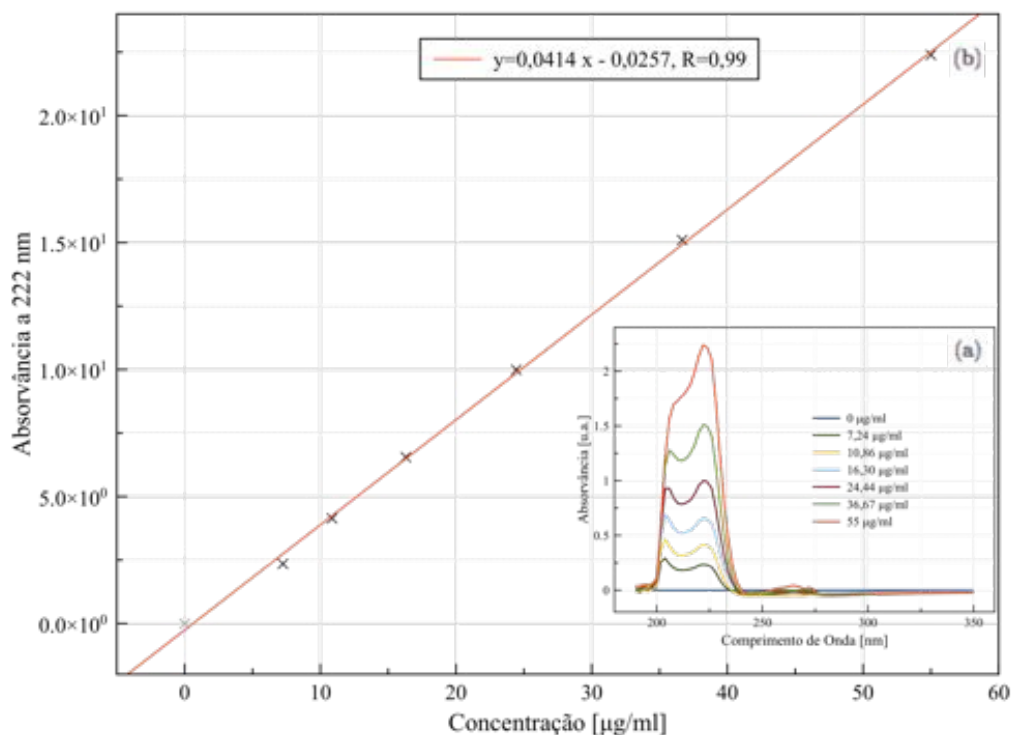


Figura 3.8: (a) Espectro de referência de absorvâncias obtido a partir de diferentes diluições de IBP diluído em PBS. O pico de referência considerado na estimativa da curva de calibração ocorre a 222 nm. (b) Curva de calibração do IBP em PBS. A preto encontram-se marcadas as absorvâncias associadas ao pico de 222 nm a que correspondem as concentrações conhecidas *a priori*. A vermelho, a regressão linear que relaciona todos os pontos tem por equação  $y = 0,0414 \cdot x - 0,0257$ , com  $R = 0,990$ , a partir da qual é possível determinar a concentração de fármaco libertado para o meio, partindo de um registo de absorvância para o mesmo comprimento de onda.

Uma vez que o pico de absorção é mais evidente aos 222 nm, a curva de calibração do IBP em PBS foi estimada correspondendo o valor deste pico à concentração de fármaco em questão. A curva de calibração pode ser observada na Figura 3.8 (b).

### 3.2.2 Testes de libertação

Antes de cada ensaio, as membranas revestidas foram deixadas em água destilada por 2 minutos, por forma a eliminar possíveis traços de IBP presentes no exterior do revestimento condutor. Para estimar a quantidade máxima de IBP encapsulada nas fibras, três amostras por cada tipo de membrana sem revestimento (mAC:IBP e cAC:IBP) foram deixadas em copos separados com PBS, tendo sido medidas as absorvâncias do meio após 24 horas. Todas as membranas foram pesadas antes do ensaio, tendo-se tido o cuidado de manter a massa constante para todas as amostras. Realizaram-se três réplicas para cada um dos ensaios.

Diferentes amplitudes de pulso foram aplicadas: +0.15 V, +0.50 V e +1.00 V, que correspondem às situações denominadas de condições estimuladas. Adicionalmente, outros dois testes sem aplicação de um potencial eléctrico externo - 0,00 V e por difusão passiva - foram realizados. Nas condições estimuladas e a 0,00 V, a membrana foi mergulhada em meio PBS juntamente com um contra-eléctrodo de prata, a uma distância fixa (2 cm). Na difusão passiva, as membranas revestidas foram mergulhadas em PBS apenas.

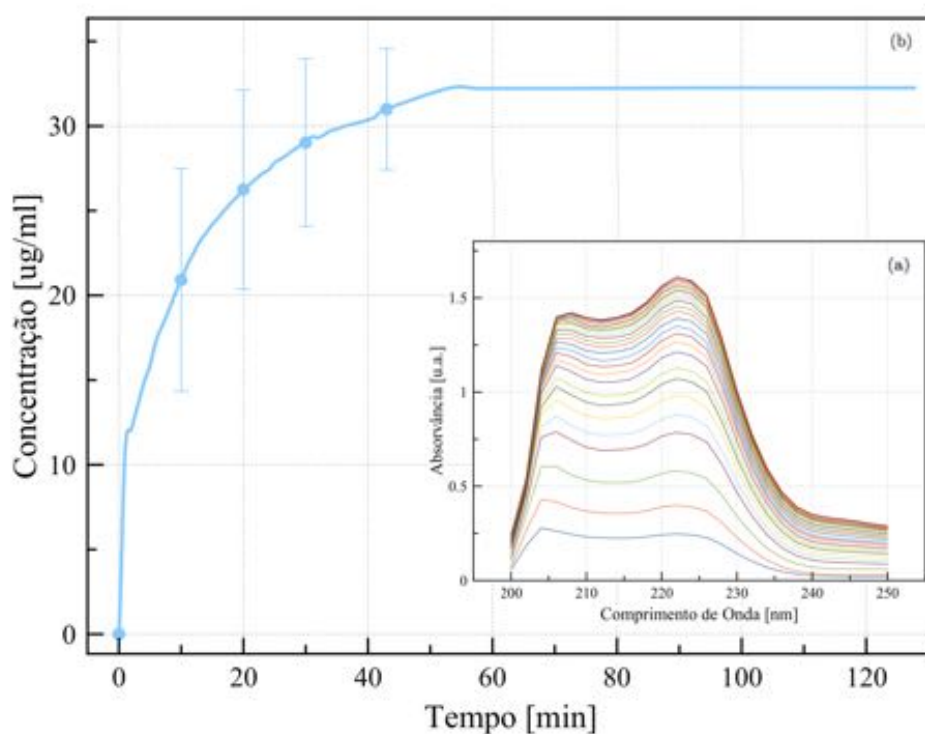


Figura 3.9: (a) Espectros de absorvâncias obtidos no teste de libertação por difusão passiva da membrana mAC:IBP/PPy, adquiridos em intervalos de tempo de 1 minuto (até aos 40 minutos), de 2 minutos (dos 40 aos 60 minutos) e de 10 minutos (até ao fim do ensaio). (b) Perfil de libertação do fármaco correspondente, representado como uma evolução temporal da variação da concentração.

Em todos os testes obtiveram-se os espectros de absorvâncias semelhantes aos mostrados na Figura 3.9 (a), com o qual se construiu o perfil de concentrações característico da liberação (Figura 3.9 (b)). Por último, normalizando as concentrações instantâneas com a concentração máxima, é possível construir o gráfico da Figura 3.10, mais adequado para correlacionar os diferentes ensaios de liberação. Outros espectros e os correspondentes perfis de liberação, podem-se encontrar no Apêndice A.

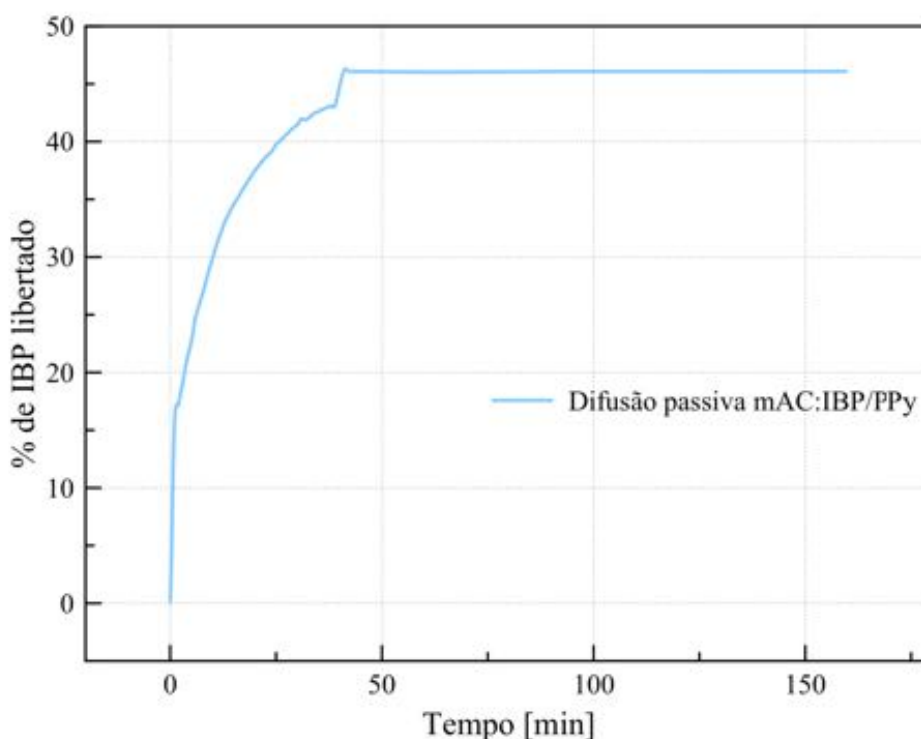


Figura 3.10: Característica de liberação normalizada para a difusão passiva da membrana mAC:IBP/PPy. Note-se o pico na liberação durante os primeiros 5 minutos, seguido da liberação lenta do fármaco até saturar perto dos 40 minutos. Encontram-se visíveis quatro barras de erro para quatro pontos da curva obtida (escolhidos de entre os 46 pontos adquiridos).

Na Figura 3.11 encontram-se as curvas características normalizadas das membranas mAC:IBP/PPy para condições passivas e estimuladas. Fibras não revestidas (representadas pela curva a negro) libertam, em pouco mais de três minutos, cerca de 80% do fármaco encapsulado, atingindo a saturação ao fim de 26 minutos. Por outro lado, em membranas revestidas mAC:IBP/PPy, as características de liberação apresentam uma evolução temporal mais controlada. Ainda assim, é observado um pico na liberação do IBP nos 20 minutos iniciais para todas as condições testadas libertando, em média, 20% do fármaco encapsulado. Ao fim de 150 minutos, todas as membranas mAC:IBP/PPy atingiram a saturação.

Como a funcionalização com PPy ocorre em meio aquoso, parte do fármaco originalmente encapsulado escapa durante a polimerização, fenómeno que pode ser observado comparando os patamares de saturação para as diferentes condições passiva e estimuladas com o da curva a negro. Ou seja, estima-se que mais de 40% do IBP escapa durante a processo de revestimento. Este facto dificulta



a comparação entre as quantidades libertadas em ensaios diferentes, pois a percentagem de fármaco poderá não ser sempre a mesma. De facto, esperar-se-ia que os patamares de saturação para as curvas das condições estimuladas fossem o mesmo. De qualquer forma, a percentagem de IBP libertado em condições estimuladas será sempre superior à quantidade libertada por difusão passiva, uma vez que não sendo electricamente estimulado, o revestimento de PPy mantém-se no seu estado reduzido, que ao manter os poros fechados, impede que o meio impregne as fibras, atenuando a libertação do fármaco. Outro resultado interessante, em condições estimuladas, é que quanto menor o potencial aplicado, mais lentamente se alcança a saturação, i.e. mais lentamente se dá a libertação.

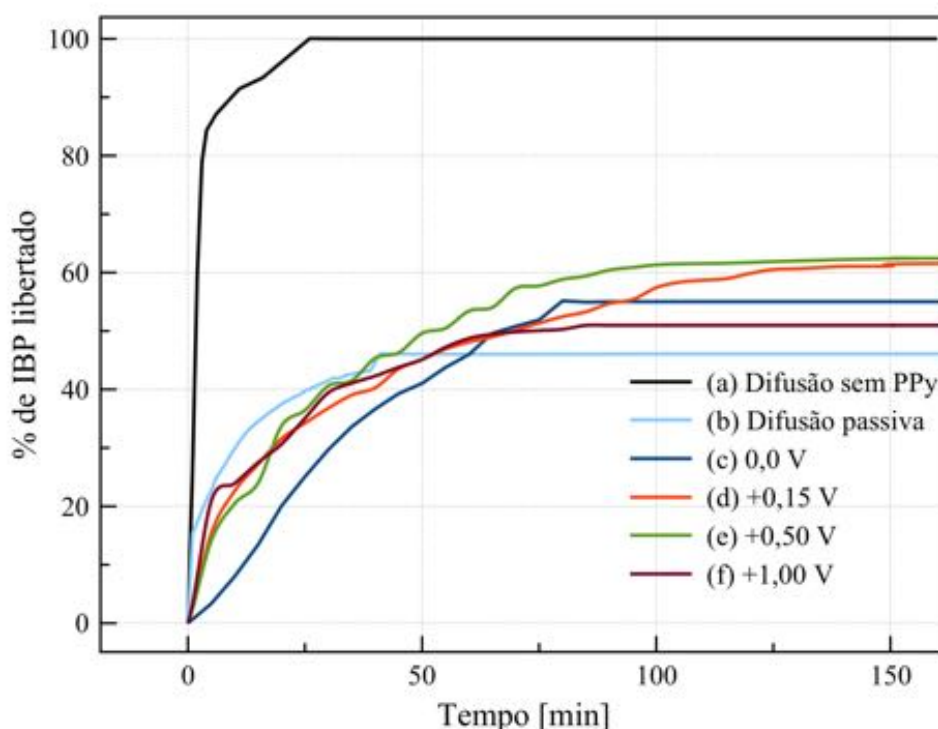


Figura 3.11: Características de libertação normalizadas para as membranas mAC:IBP/PPy. Na curva a negro (a), encontra-se a característica de libertação para fibras não revestidas. A concentração máxima de fármaco nestas fibras é de  $69 \mu\text{g/ml}$ , tendo sido este o valor empregue na normalização das outras curvas. Em (b) e (c), a difusão do fármaco deu-se sem a aplicação de estimulação eléctrica externa, e em (d), (e) e (f) aplicaram-se pulsos eléctricos externos.

No caso da curva (c), que representa o comportamento da libertação de IBP de uma amostra mergulhada em PBS em conjunto com o contra-eléctrodo de prata, sem aplicação de um estímulo eléctrico externo, observa-se que a difusão se dá de forma similar ao da curva (e) - condição estimulada a  $+0.5 \text{ V}$  - acabando por saturar pouco antes da curva (f) - condição estimulada a  $+1.0 \text{ V}$ . No entanto, o esperado seria que a libertação se desse de forma análoga à difusão passiva (b). Porém, o comportamento da curva sugere a criação de uma diferença de potencial entre o eléctrodo de prata e a membrana, suficientemente elevada para permitir a "auto-estimulação" da membrana mAC:IBP/PPy, induzindo o estado oxidado ao PPy. Inclusivamente, é interessante reparar que nos primeiros 20 minutos do ensaio, a libertação se inicia mais suavemente.



Na Figura 3.12 encontram-se traçadas as curvas características normalizadas para as membranas obtidas por electrofiação coaxial e funcionalizadas com PPy (cAC:IBP/PPy). Fibras não funcionalizadas (a) libertam em 25 minutos 80% do IBP nelas encapsulado, apenas atingindo a saturação ao fim de 300 minutos, um tempo consideravelmente superior às fibras obtidas pelo método anterior. Os patamares de saturação para as condições estimuladas são superiores ao da difusão passiva, já que neste caso o PPy mantém-se no seu estado reduzido. Adicionalmente, verifica-se que nos primeiros 20 minutos ocorre a libertação de cerca de 10% de IBP e que ao fim de 370 minutos, todas as amostras já atingiram a saturação. Como no caso anterior, quanto mais baixa a amplitude do estímulo aplicado, mais lentamente se dá a libertação, logo mais controladamente.

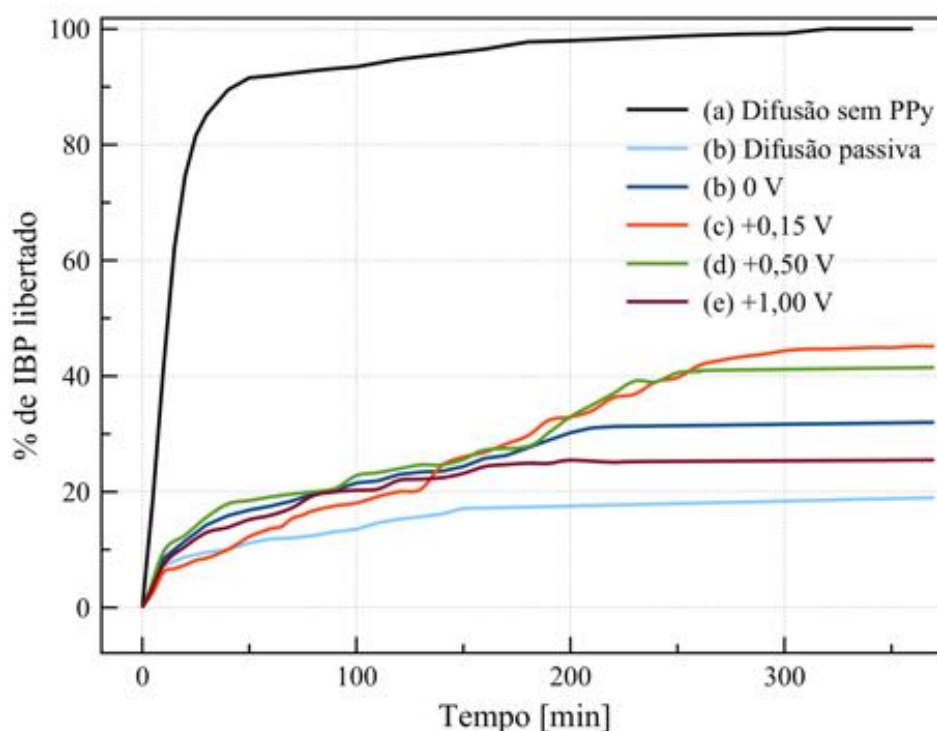


Figura 3.12: Características de libertação normalizadas para as membranas cAC:IBP/PPy. A concentração máxima de fármaco encontrada encapsulada nas fibras sem revestimento é de 55  $\mu\text{g/ml}$ , tendo sido este o valor empregue na normalização das outras curvas. Em (b) e (c), a difusão do fármaco deu-se sem a aplicação de estimulação eléctrica externa.

Como anteriormente, os patamares de saturação para as condições estimuladas deveriam ser iguais. Não o são devido a diferenças na quantidade de IBP encapsulado nas fibras. O resultado da curva para 0 V é interessante: até alcançar a saturação aos 200 minutos, a libertação ocorre de forma semelhante aos ensaios em condições estimuladas, sugerindo a existência de um potencial entre a membrana, o eléctrodo de prata e/ou o meio de libertação.

Na Figura 3.13, pode-se observar um gráfico comparativo dos resultados dos ensaios de libertação até aqui discutidos. Uma vez que o método de produção das fibras coaxiais não é o optimizado, e apesar da solução nuclear possuir a mesma massa de IBP que a solução de AC:IBP utilizada para electrofiar as fibras mAC:IBP/PPy, as concentrações máximas encontradas nos dois tipos de

membranas não foram os mesmos. Ou seja, no que se refere à quantidade de IBP libertado em ambos os ensaios, nada se pode concluir, já que para mAC:IBP a concentração máxima é de  $69 \mu\text{g/ml}$  e para cAC:IBP é de  $55 \mu\text{g/ml}$ . No entanto, pode-se discutir o comportamento da libertação ao longo do tempo.

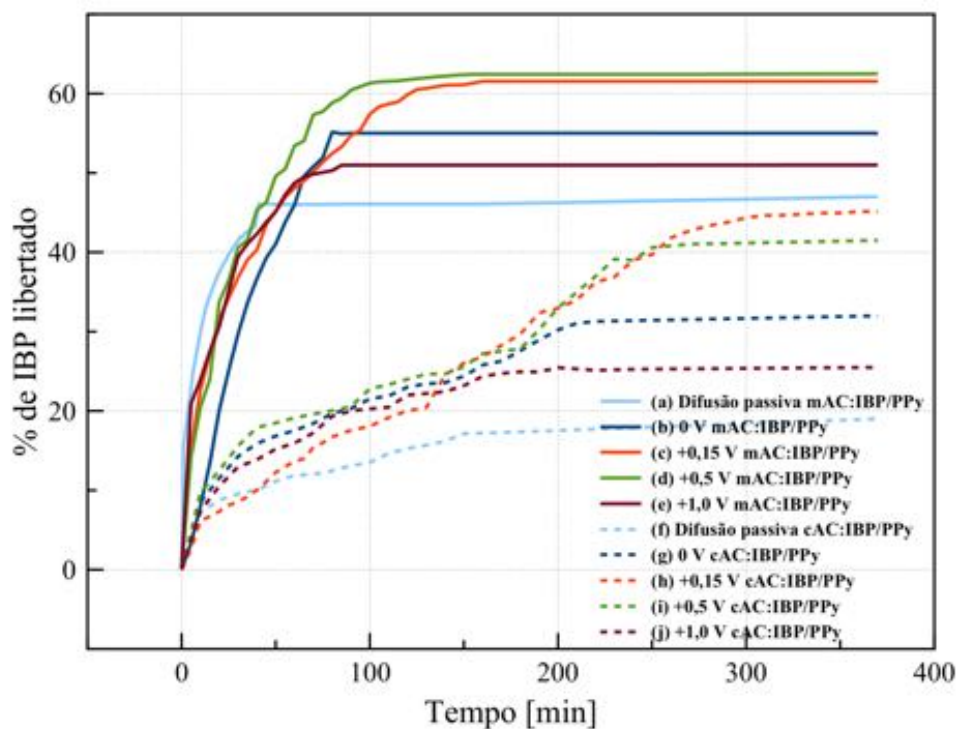


Figura 3.13: Comparação das características de libertação de mAC:IBP/PPy ((a) a (e)) e cAC:IBP/PPy ((f) a (j)). Uma vez que as concentrações máximas de IBP em cada tipo de fibra é diferente, não se pode relacionar a quantidade de fármaco libertada nos dois ensaios. No entanto, é possível comparar as diferenças no tempo de chegada à saturação:  $\Delta t_{(a)(f)} = 110 \text{ min}$ ;  $\Delta t_{(b)(g)} = 140 \text{ min}$ ;  $\Delta t_{(c)(h)} = 220 \text{ min}$ ;  $\Delta t_{(d)(i)} = 125 \text{ min}$ ;  $\Delta t_{(e)(j)} = 115 \text{ min}$ .

Pela Figura 3.13, a conclusão imediata é que a libertação do IBP das fibras coaxiais é mais lenta e linear que nas fibras produzidas pelo método convencional, sugerindo um melhor encapsulamento do fármaco, conforme esperado. De facto, comparando as curvas (c) e (h), é evidente a discrepância no tempo em que se dá a saturação: cAC:IBP/PPy satura cerca de 220 minutos depois de mAC:IBP/PPy. Mesmo comparando os outros conjuntos de curvas ((a) e (f), (b) e (g), (d) e (i), (e) e (j)), a saturação das fibras coaxiais ocorre muito mais lentamente que para as fibras obtidas pelo método de electrofiação convencional.

Um outro polímero condutor, o PEDOT, foi testado nas membranas electrofiadas pelo método convencional, apenas para a situação em que se aplica  $+0.15 \text{ V}$ . Neste caso, o protocolo de funcionalização de membranas apenas requer que as amostras sejam imersas em solução aquosa por 15 minutos, em vez dos habituais 65 minutos para a polimerização do PPy, o que significa que nos ensaios de libertação correspondentes, na teoria atingir-se-ão valores de concentrações de IBP superiores aos alcançados pelas membranas revestidas de polipirrol.

Na Figura 3.14 encontra-se a característica de liberação para uma amostra de membrana obtida por electrofiação convencional e revestida com PEDOT (mAC:IBP/PEDOT) comparada com a análoga revestida com PPy. Não se realizaram ensaios de liberação para membranas coaxiais com este revestimento, porque com o processo de polimerização, as amostras ficaram mal polimerizadas e demasiadamente frágeis. No entanto, na mesma figura, encontra-se também a característica de liberação de cAC:IBP/PPy para fins comparativos.

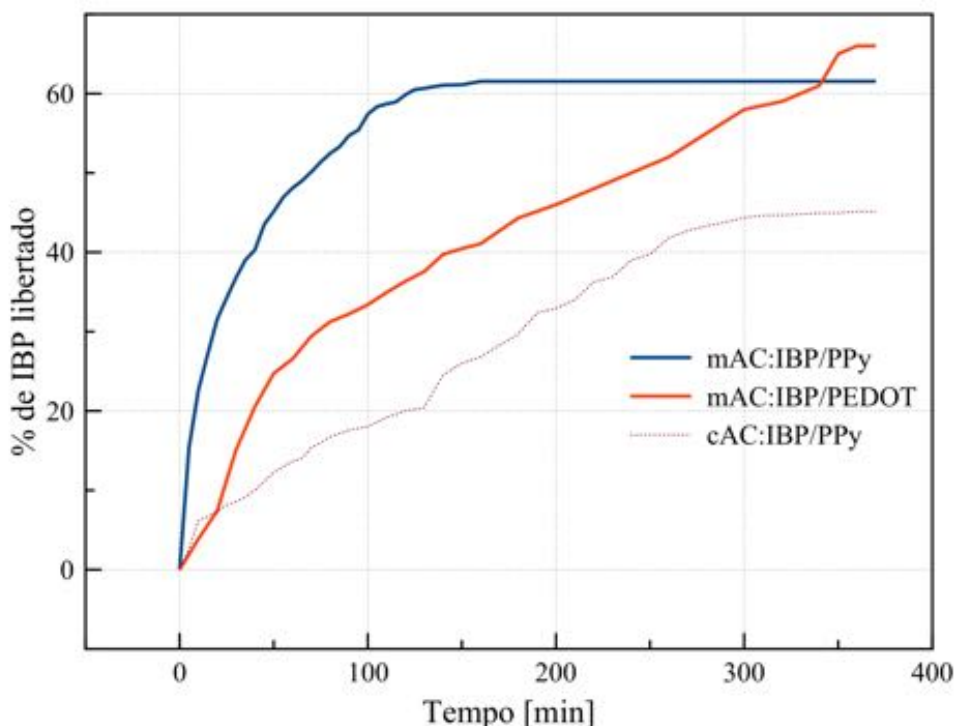


Figura 3.14: Comparação das características de liberação de mAC:IBP/PEDOT com mAC:IBP/PPy e cAC:IBP/PPy. Repare-se no comportamento das liberações e nas quantidades de IBP libertadas por cada uma das membranas.

Comparando as curvas a cheio da Figura 3.14, conclui-se que a liberação em fibras revestidas de PEDOT se dá mais lentamente, logo mais controladamente, que nas revestidas com PPy. Desta forma, a saturação de mAC:IBP/PEDOT dá-se cerca de 200 minutos depois de mAC:IBP/PPy. Adicionalmente, a percentagem de IBP libertado é, de facto, superior em 5%, não representando uma diferença significativa, o que é natural, uma vez que bastam pouco mais de 3 minutos para que uma membrana não revestida liberte cerca de 80% do fármaco encapsulado. Além disso, o pico de liberação encontra-se mais atenuado, sugerindo que o fármaco apenas se encontra no interior da fibra, não estando presente no exterior do revestimento. Ainda assim, nos 50 minutos iniciais, a membrana liberta 25% do IBP.

É interessante observar que a característica mAC:IBP/PEDOT possui um comportamento aproximadamente semelhante a cAC:IBP/PPy: ambas são aproximadamente lineares até alcançar o patamar de saturação, que ocorre ao mesmo tempo para os dois casos. Desta forma, é possível formular uma hipótese de qual será o possível comportamento para fibras coaxiais funcionalizadas

com PEDOT, já que este ensaio não foi possível de se realizar. É possível que a libertação seja ainda mais controlada. Como a concentração de IBP diminui do centro da fibra para a periferia e porque são necessários cerca de 13 minutos para libertar 50% do IBP em fibras não revestidas, a percentagem de fármaco libertado seria muito superior, quando comparado às fibras convencionais.

### 3.3 Medidas eléctricas

#### 3.3.1 Condutividade - curvas I-V

Conforme já mencionado, calcularam-se os valores das condutividades para as diferentes membranas a partir das curvas de corrente-tensão (I-V) tendo em conta a geometria das amostras. Estas curvas foram obtidas aplicando uma gama de potencial eléctrico e medindo os respectivos valores de corrente. A condutividade da amostra é dada por:

$$\sigma = \frac{l}{A} \times \frac{I}{V} = \frac{l}{A \times R} \quad (3.1)$$

onde  $R$  é a resistência da amostra e  $A$  a área da secção transversal da membrana atravessada pela corrente  $I$ , a unidade é Siemens por centímetro ( $S/cm$ ). O declive das rectas obtidas para as curvas I-V representam o inverso da resistência  $R$ , logo  $I/V$ . Para exemplificar, na Figura 3.15 encontra-se uma das curvas corrente-tensão obtidas. Obtiveram-se estas curvas para todas as amostras funcionalizadas, antes e depois dos ensaios de libertação.

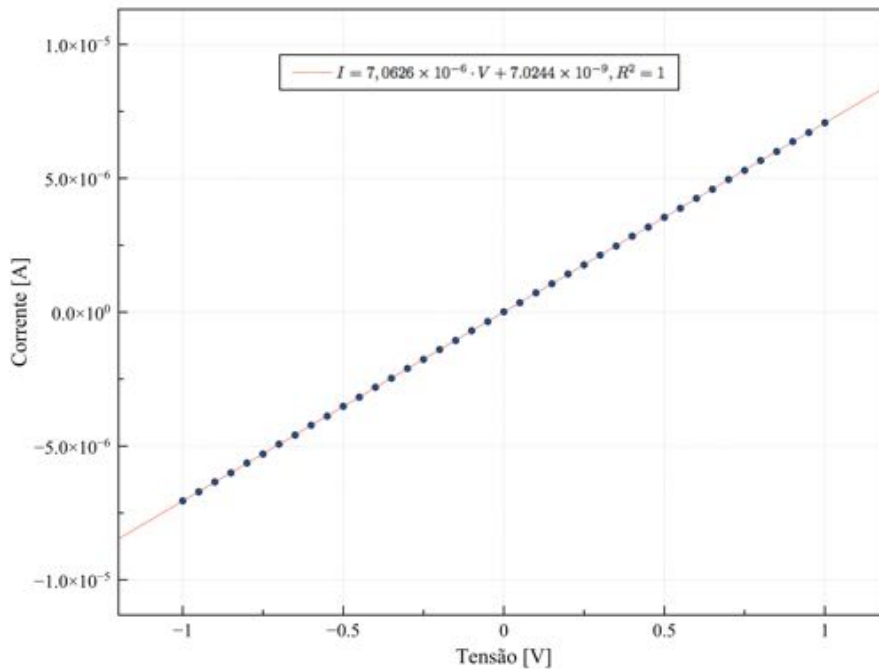


Figura 3.15: Curva I-V obtida para uma amostra mAC:IBP/PPy para a condição de difusão passiva (não estimulada), anterior ao ensaio de libertação. Encontra-se representada, em conjunto com os pontos adquiridos, a regressão linear com a qual é possível determinar o declive da curva.

Na Tabela 3.1 encontram-se os valores das condutividades das membranas electrofiadas revestidas de PPy ou PEDOT, antes e depois dos ensaios de libertação. De um modo geral, para cada tipo de membrana, a condutividade inicial é superior à final. Este resultado deve-se ao facto de parte do revestimento condutor se perder após a libertação do fármaco, independentemente da condição de libertação. O único valor que destoa dos outros é o de  $\sigma_{final}$  para +0,15 V da amostra mAC:IBP/PPy, mas este encontra-se dentro do intervalo de erro de  $\sigma_{inicial}$ , logo pode-se concluir que de facto os valores finais da condutividade são sempre inferiores aos iniciais. Supõe-se que este efeito seja devido à criação de ligações entre os fosfatos do meio PBS às cadeias poliméricas ou devido a alterações na protonação das mesmas [41].

Adicionalmente, esperar-se-ia que a não uniformidade no revestimento de PPy nas fibras cAC:IBP/PPy provocasse uma diminuição da condutividade nestas fibras relativamente às mAC:IBP/PPy. No entanto verifica-se o contrário. Este resultado pode ser explicado com a diminuição dos diâmetros das fibras que, por aumentar o rácio área/volume, vai permitir que a polimerização se dê mais acentuadamente produzindo membranas mais condutoras.

Também na Tabela 3.1 constam os resultados das condutividades estimadas para amostras revestidas com o novo polímero condutor, PEDOT. Verifica-se que as duas condutividades (inicial e final) são iguais, sugerindo que durante a libertação do fármaco praticamente não ocorre degradação do revestimento. Além disso, a condutividade das fibras revestidas de PPy representam um centésimo da condutividade das fibras funcionalizadas com PEDOT, e essa pode ser a razão pela qual a libertação ocorre de forma mais controlada.

Tabela 3.1: Estimativas das condutividades das membranas electrofiadas convencionalmente ou coaxialmente, revestidas de PPy ou PEDOT, antes e depois dos ensaios de libertação. Os valores foram estimados utilizando os parâmetros geométricos de cada membrana (largura, comprimento e espessura) e a Eq. 3.1. <sup>(a)</sup> - às amostras mAC:IBP/PEDOT, apenas se efectuou uma medida. Por esta razão estes valores não apresentam incerteza.)

	Condições de Libertação	Condutividade [ $S/cm$ ]	
		$\sigma_{inicial}$	$\sigma_{final}$
mAC:IBP/PPy	0,00 V	$3,8 \times 10^{-2} \pm 3,2 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-3}$
	+0,15 V		$4,4 \times 10^{-2} \pm 3,1 \times 10^{-2}$
	+0,50 V		$1,5 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-3}$
	+1,00 V		$1,9 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-3}$
	Difusão passiva		$2,3 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-3}$
cAC:IBP/PPy	0,00 V	$5,2 \times 10^{-2} \pm 1,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-3} \pm 9,0 \times 10^{-4}$
	+0,15 V		$3,8 \times 10^{-5} \pm 2,6 \times 10^{-5}$
	+0,50 V		$7,1 \times 10^{-6} \pm 2,4 \times 10^{-6}$
	+1,00 V		$1,7 \times 10^{-6} \pm 1,3 \times 10^{-6}$
	Difusão passiva		$2,6 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-3}$
mAC:IBP/PEDOT	+0,15 V	$4,0^{(a)}$	$4,0^{(a)}$

### 3.3.2 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica permite estudar o comportamento electroquímico dos polímeros intrínsecamente condutores, como é o caso do PPy, permitindo a determinação de quais os processos que dominam: se as reações de oxidação, se as de redução. Num primeiro ensaio, utilizou-se um fio de prata, como electrólito 20 ml de PBS, e no eléctrodo colocou-se uma membrana mAC:IBP/PPy, tendo-se realizado 30 ciclos à velocidade 100 mV/s. Num segundo ensaio, repetiram-se os passos anteriores para uma membrana coaxial revestida de polipirrol (cAC:IBP/PPy).

Na Figura 3.16 podem-se observar os voltamogramas para o 5º e 30º ciclos para as membranas mAC:IBP/PPy (vermelho) e cAC:IBP/PPy (negro) no eléctrodo de trabalho à velocidade de 100 mV/s.

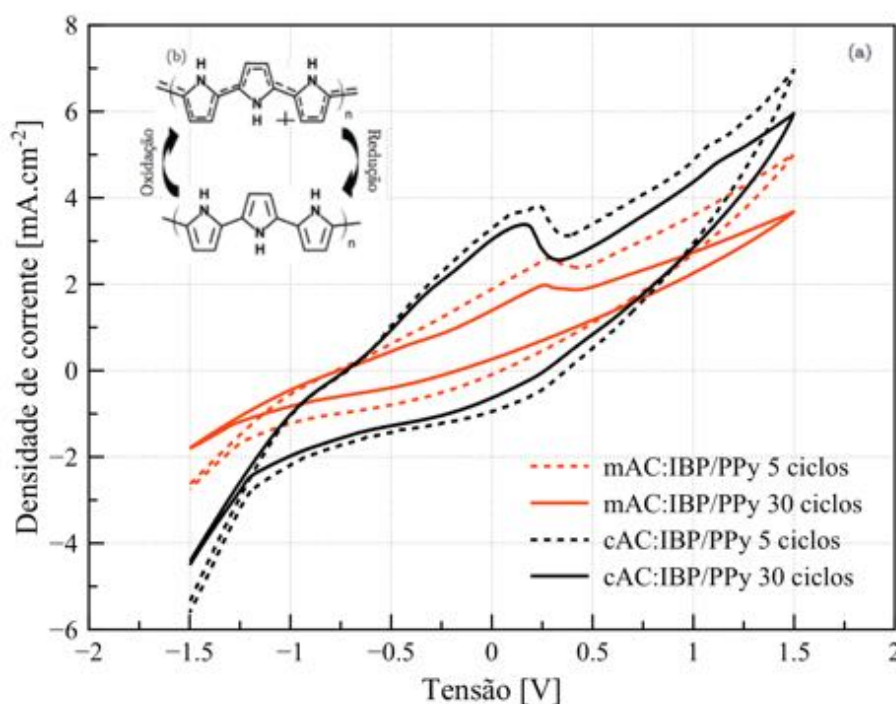


Figura 3.16: Voltamogramas do 5º e 30º ciclos (a) para as membranas mAC:IBP/PPy e cAC:IBP/PPy, obtidas para a velocidade de varrimento 100 mV/s. (b) - reações redox reversíveis do PPy (adaptado de [43]).

Analisando a figura, conclui-se que tanto para mAC:IBP/PPy como para cAC:IBP/PPy, apenas é evidente um pico de oxidação, registado a 0,30 V e 0,20 V, respectivamente. A existência de picos logo ao 5º ciclo sugere que existe um pico na libertação de IBP, que de facto se comprova com os resultados obtidos para os testes de libertação. A reacção de oxidação que governa ambos os picos observados é:



Adicionalmente, apesar de pouco visível, as curvas cAC:IBP/PPy apresentam um pico de redução estimado a aproximadamente -0,20 V e as curvas mAC:IBP/PPy possuem-no a -0,30 V, sugerindo a redução do PPy:



Devido à simetria dos picos de oxidação e redução (0,3 V e -0,3 V para mAC:IBP/PPy; 0,2 V e -0,2 V para cAC:IBP/PPy), é possível classificar o processo como *quasi-reversível*, no qual as reacções são provocadas pelas interações entre os iões do PBS e os eléctrodos, resultado que pode ser confirmado pela razão de densidades de corrente de redução ( $j_{pc}$ ) e de oxidação ( $j_{pa}$ ). Para mAC:IBP/PPy,  $|j_{pc}/j_{pa}| = 1,556$  e para cAC:IBP/PPy,  $|j_{pc}/j_{pa}| = 1,688$ .

Por fim, comparando os resultados dos ensaios de libertação com os aqui obtidos, pode-se relacionar a rapidez da libertação do fármaco em condições estimuladas com os picos de oxidação registados para os dois casos. Nestas condições, verificou-se que para valores menores do potencial aplicado às membranas, mais controladamente se dá a libertação do fármaco do interior destas. De facto, se por exemplo se compararem os valores de tensão aplicados (0,15 V; 0,50 V e 1,0 V) com o potencial de oxidação das fibras cAC:IBP/PPy, que ocorre a 0,20 V, este resultado é mais facilmente compreendido: como 0,15 V se encontra mais perto do pico de oxidação que 0,50 V, então a libertação do fármaco dá-se mais suavemente que no último caso. No entanto, à medida que se aplica um potencial cada vez mais elevado, continua a ocorrer a oxidação, mais mas acentuadamente, induzindo a abertura de poros maiores na estrutura de PPy à superfície das fibras ou mesmo fragmentando as membranas, logo expondo-as ao meio PBS, induzindo assim a libertação mais rápida do fármaco.





## Capítulo 4

# Conclusões e perspectivas futuras

O desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármaco, cujo controlo se realiza através da aplicação de estímulos eléctricos a uma membrana de acetato de celulose contendo ibuprofeno no seu interior, constitui o objectivo principal desta dissertação. Esse estudo contemplou duas fases distintas: a produção de membranas poliméricas de acetato de celulose com incorporação de fármaco e revestimento condutor de polipirrol; e o estudo do funcionamento destas membranas como sistema de libertação controlada de fármaco. Adicionalmente, foi também testado o revestimento com PEDOT.

Começou-se por produzir membranas poliméricas de acetato de celulose e ibuprofeno através da técnica de electrofiação, tendo sido adotado um protocolo estudado e otimizado em trabalhos realizados por outros colegas que estudaram no passado ou em simultâneo com esta tese, a incorporação de fármaco em membranas de acetato de celulose. As membranas obtidas foram revestidas com o polímero condutor polipirrol, conseguido através da polimerização *in situ* em solução aquosa do pirrol e imergindo a amostra de membrana na presença do agente oxidante cloreto de ferro (III), por um período de 65 minutos. A morfologia das membranas antes e após a libertação do fármaco foi avaliada por SEM. As fibras obtidas apresentam morfologia semelhante às produzidas por Romba [22], verificando-se a deposição contínua do polímero condutor ao longo de toda a fibra e a existência de aglomerados deste polímero, possivelmente devido à lavagem insuficiente das membranas após a funcionalização. Verificou-se que, após a libertação do fármaco, houve uma perda de parte do revestimento condutor e também a diminuição dos aglomerados de polipirrol anteriormente observados, resultado que valida a perda de condutividade da membrana (*vide* Tabela 3.1). Adicionalmente, verificou-se uma diminuição do diâmetro médio das fibras com o teste de libertação, estimado em cerca de 20% relativamente aos valores iniciais. A espessura de polipirrol formada após a polimerização foi de aproximadamente 42 nm.

A principal inovação deste trabalho relativamente aos anteriormente citados, consistiu na utilização na técnica de electrofiação coaxial por forma a melhorar a incorporação de fármaco nas membranas e também o respectivo controlo da libertação. Neste caso, o ibuprofeno encontra-se incorporado no núcleo da fibra de acetato de celulose. As fibras foram revestidas de polímero condutor polipirrol e realizadas caracterizações em tudo semelhantes às membranas obtidas pelo método anterior. Imagens de SEM obtidas para fibras não revestidas não evidenciam uma estrutura coaxial, contrariamente ao esperado. Por outro lado, quando revestidas, as fibras apresentam uma estrutura *core-shell* que, no

entanto, pode ser devido à existência do polímero condutor à superfície das fibras. Também as imagens obtidas em TEM não evidenciam a estrutura desejada para fibras revestidas antes da libertação, embora sejam observados grânulos de polipirrol à superfície da fibra, contendo possivelmente fármaco no seu interior que podem ser resultado do método de funcionalização das membranas, que para o caso do PPy se efectua em solução aquosa durante 65 minutos, tempo suficiente para permitir a difusão do fármaco para a periferia da fibra onde ocorre a polimerização do monómero pirrol. Uma vez que a solução que constitui o núcleo da fibra se trata de ibuprofeno dissolvido em etanol, que não sendo solvente do acetato de celulose mas miscível com a acetona e com o DMAc, este poderá ter difundido pela bainha externa, não evidenciando desta forma a estrutura coaxial desejada. No entanto, imagens TEM de membranas coaxiais revestidas depois da libertação do fármaco nelas contido, revelam a existência de uma estrutura oca no núcleo das fibras, possivelmente devido à "lavagem" de ibuprofeno para o meio PBS. Os diâmetros obtidos por este método são inferiores em cerca de 20% relativamente às fibras produzidas pelo *setup* convencional (para membranas não revestidas), possivelmente devido à existência de um solvente extra, o etanol da solução nuclear, que poderá diminuir a viscosidade, logo o diâmetro das fibras. Desta forma, a funcionalização das membranas com polipirrol poderá não ter ocorrido nas condições optimizadas para este tipo de fibras em particular, sendo evidente nas imagens TEM e SEM a falta de uniformidade do revestimento condutor ao longo das fibras. Ainda assim, as condutividades obtidas para amostras coaxiais antes da libertação, encontram-se dentro da gama de valores das análogas para as membranas obtidas pelo método convencional (*vide* Tabela 3.1). À semelhança do anteriormente observado, após a libertação do fármaco do interior das membranas, parte do revestimento condutor é perdido, originando a perda de condutividade observada. Adicionalmente, verifica-se que após o ensaio de libertação as membranas ficam mais frágeis e quebradiças, apresentando roturas nas fibras.

Aos dois tipos de membranas produzidas foram realizados testes de libertação em condições de difusão passiva e estimulada (*vide* Tabela 2.6). De um modo geral, nos dois tipos de membranas a difusão passiva dá-se mais rapidamente que em condições estimuladas, devido à permanência do estado reduzido do polipirrol à superfície das fibras, que ao manter os poros fechados, diminui a libertação do fármaco. Adicionalmente, os ensaios de libertação mostraram que para condições estimuladas, quanto menor o potencial aplicado, mais lentamente se dá a libertação.

Relativamente aos ensaios realizados às fibras obtidas pelo método de electrofiação convencional, observou-se a saturação da libertação até perto dos 150 minutos enquanto que para as fibras coaxiais, a saturação deu-se até aos 370 minutos, um tempo consideravelmente superior ao anterior. Ou seja, fibras coaxiais libertam o fármaco a uma taxa mais controlada, evidenciando o melhoramento da incorporação do ibuprofeno no interior das fibras. Já que as concentrações máximas de ibuprofeno estimadas para os dois tipos de membranas produzidas são diferentes, nada se pode concluir relativamente à quantidade de fármaco libertado. No entanto, esta técnica poderá ser utilizada para encapsular quantidades de fármaco superiores à utilizada neste estudo, sem que se comprometa a integridade da matriz electrofiada. Adicionalmente, outro resultado importante são os picos de libertação observados em todos os ensaios. No método convencional, devido ao processo de electrofiação que provoca a evaporação rápida do solvente devido à alta força iónica exercida, as partículas do fármaco tendem a ficar na superfície das nanofibras de polímero. Logo, nos testes, estas partículas de fármaco serão as primeiras a se libertar, originando os picos observados na libertação. Com o sistema coaxial, estes picos são ligeiramente atenuados, evidenciando uma vez mais a melhoria na encapsulação do fármaco no interior das fibras.

Um outro resultado interessante é o comportamento anómalo da característica de libertação obtida nos ensaios a 0,0 V. Apesar de neste caso a amostra se encontrar mergulhada em PBS em conjunto com um eléctrodo de prata, sem que se aplique um estímulo eléctrico à membrana, o que se verificou foi que a característica obtida é semelhante às obtidas para as condições estimuladas e não à obtida para situações passivas, indiciando a existência de um potencial entre a amostra e o eléctrodo. Esta diferença de potencial poderá provocar a "auto-estimulação" da membrana, induzindo a libertação do ibuprofeno nela incorporado.

Através da técnica de voltametria cíclica, realizada a duas amostras de membrana electrofiada e co-electrofiada, foi possível observarem-se os picos de oxidação e redução do polipirrol, sendo mais visível o crescimento dos primeiros, o que evidencia o estado oxidado do polímero condutor, logo a libertação do fármaco em condições estimuladas, comprovando os resultados dos ensaios de libertação efectuados.

Outro tipo de revestimento condutor, o PEDOT, foi testado nas membranas obtidas pelo método convencional apenas para a situação de condição estimulada (a +0,15 V). Neste caso, o protocolo de funcionalização adoptado apenas requer que as amostras sejam emergidas em solução aquosa por 15 minutos, em vez dos habituais 65 minutos para a polimerização do polipirrol. Neste caso, a libertação deu-se mais lentamente, tendo-se atingido a saturação cerca de 200 minutos depois das fibras revestidas com PPy. Adicionalmente, verificou-se que a quantidade de ibuprofeno libertado para o meio foi cerca de 5% superior à quantidade libertada pelas mesmas fibras revestidas com o outro polímero condutor, e que o pico de libertação é substancialmente mais atenuado, sugerindo que o fármaco apenas se encontra no interior da fibra, não estando presente no exterior do revestimento. De facto, através da análise morfológica foi possível verificar que a deposição deste polímero ao longo das fibras de acetato de celulose é mais uniforme, não apresentando aglomerados como no caso do polipirrol e que, para depois da libertação, as membranas encontram-se mais quebradas sendo visível a existência de pedaços de PEDOT à superfície das fibras.

Não se realizaram ensaios de libertação para membranas coaxiais com revestimento PEDOT, porque com o processo de polimerização, as amostras ficaram mal revestidas e demasiadamente frágeis para serem manuseadas. No entanto, é curioso que a característica de libertação para as fibras electrofiadas e revestidas por este polímero possuem um comportamento aproximadamente semelhante às fibras coaxiais revestidas de polipirrol: ambas possuem uma libertação linear até alcançar o patamar de saturação, que para os dois casos ocorre no mesmo período. Assim, é possível formular uma hipótese de qual será o possível comportamento da libertação para fibras coaxiais revestidas de PEDOT: a libertação será ainda mais controlada. Ora, como a concentração de fármaco diminui do centro da fibra para a periferia e porque são necessários cerca de 13 minutos para libertar cerca de 50% do ibuprofeno em fibras não revestidas, a quantidade de fármaco libertado será muito superior à das fibras convencionais. No entanto, este resultado apenas representa uma tendência, logo seria necessário otimizar o processo de funcionalização com PEDOT para este tipo de fibras e realizar os testes necessários para a sua caracterização e funcionalidade como sistema de libertação controlada de fármaco.



# Bibliografia

- [1] S. Geetha, C. R. K. Rao, M. Vijayan, and D. C. Trivedi, "Biosensing and drug delivery by polypyrrole," *Analytica Chimica Acta*, vol. 568, pp. 119–125, 2006.
- [2] K. Kim, Y. K. Luu, C. Chang, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, "Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds," *Journal of Controlled Release*, vol. 98, pp. 47–56, 2004.
- [3] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1989–2006, 2008.
- [4] J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 92, pp. 227–231, 2003.
- [5] S. Tungprapa, I. Jangchud, and P. Supaphol, "Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats," *Polymer*, vol. 48, pp. 5030–5041, 2007.
- [6] N. Bolgen, I. Vargel, P. Korkuzus, Y. Z. Menciloglu, and E. Piskin, "In vivo performance of antibiotic embedded electrospun pcl membranes for prevention of abdominal adhesions," *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, no. 81, pp. 530–543, 2007.
- [7] E.-R. Kenawy, F. I. Abdel-Hay, M. H. El-Newehy, and G. E. Wnek, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 113, pp. 296–302, 2009.
- [8] C. He, Z. Huang, X. Han, L. Liu, H. Zhang, and L. Chen, "Coaxial Electrospun Poly(L,Lactide Acid) Ultrafine Fibers for Sustained Drug Delivery," *Journal of Macromolecular Science, Part B*, vol. 45, no. 4, pp. 515–524, 2006.
- [9] Z. Sun, E. Zussman, A. L. Yarin, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning," *Advanced Materials*, vol. 15, no. 22, pp. 1929–1932, 2003.
- [10] Y. Zhang, Z. M. Huang, X. Xu, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin bi-component nanofibers by coaxial electrospinning," *Chemistry of Materials*, vol. 16, no. 22, pp. 3406–3409, 2004.
- [11] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, and W. Chen, "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents," *Journal of Controlled Release*, vol. 108, pp. 237–243, 2005.
- [12] Z. Huang, C. He, A. Yang, Y. Zhang, X. Han, J. Yin, and Q. Wu, "Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning," *Journal Biomed Mater Res*, vol. 77,

- pp. 169–179, 2006.
- [13] K. Kontturi, P. Pentti, and G. Sundholm, “Polypyrrole as a model membrane for drug delivery,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 453, pp. 231–238, 1998.
  - [14] D. Müller, C. R. Rambo, D.o.s.recouvreur, L. M. Porto, and G. M. O. Barra, “Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers,” *Synthetic Metals*, vol. 161, pp. 106–111, 2010.
  - [15] A. G. Badgular, V. a. Bambole, and P. a. Mahanwar, “Preparation and characterization of polypyrrole-modified henequen fiber-reinforced polymethylmethacrylate composites,” *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, vol. 50, pp. 1281–1287, 2011.
  - [16] D. Müller, C. R. Rambo, L. M. Porto, W. H. Schreiner, and G. M. O. Barra, “Structure and properties of polypyrrole/bacterial cellulose nanocomposites,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 94, no. 1, pp. 655–662, 2013.
  - [17] L. Tang, J. Han, Z. Jiang, S. Chen, and H. Wang, “Flexible conductive polypyrrole nanocomposite membranes based on bacterial cellulose with amphiphobicity,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 117, pp. 230–235, 2015.
  - [18] R. Wadhwa, C. F. Lagenaur, and X. T. Cui, “Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode,” *Journal of Controlled Release*, vol. 110, pp. 531–541, 2006.
  - [19] X. Luo, C. Matrangola, S. Tan, N. Alba, and X. T. Cui, “Carbon nanotube nanoreservoir for controlled release of anti-inflammatory dexamethasone,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 26, pp. 6316–6323, 2011.
  - [20] D. Esrafilzadeh, J. M. Razal, S. E. Moulton, E. M. Stewart, and G. G. Wallace, “Multifunctional conducting fibres with electrically controlled release of ciprofloxacin,” *Journal of Controlled Release*, vol. 169, pp. 313–320, 2013.
  - [21] A. Baptista, I. Ferreira, and J. Borges, *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*, ch. Cellulose-Based Bioelectronic Devices. No. 4, Intech, 2013.
  - [22] B. I. E. Romba, “Dispositivos electrónicos multifuncionais,” Master’s thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2013.
  - [23] C. Yan, J. Zhang, J. He, H. Li, and Y. Zhang, “Homogeneous acetylation of cellulose at relatively high concentrations in an ionic liquid,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 3, no. 18, pp. 515–522, 2010.
  - [24] W. Zhou, J. He, S. Cui, and W. Gao, “Studies of electrospun cellulose acetate nanofibrous membranes,” *The Open Materials Science Journal*, no. 5, pp. 51–55, 2011.
  - [25] Z. Huang, Y. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, “A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites,” *Composites Science and Technology*, no. 63, pp. 2223–2253, 2003.
  - [26] H. Liu and y.-l. Hsieh, “Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate,” *Journal of Polymer Science*, vol. 40, pp. 2119 – 2129, 2002.
  - [27] V. Beachley and X. Wen, “Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and

- length,” *Mater Sci Eng*, vol. 29, no. 3, pp. 663 – 668, 2009.
- [28] E. Zussman, A. L. Yarin, and D. Weihs, “A micro-aerodynamic decelerator based on permeable surfaces of nanofiber mats,” *Experiments in Fluids*, no. 33, pp. 315 – 320, 2002.
- [29] J. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. Beck Tan, “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles,” *Polymer*, no. 42, pp. 261 – 272, 2001.
- [30] J. H. Burroughes, D. D. C. Bradley, A. R. Brown, R. N. Marks, K. Mackay, R. H. Friend, P. L. Burns, and A. B. Holmes, “Light-emitting diodes based on conjugated polymers,” *Nature*, no. 347, pp. 539–541, 1990.
- [31] M. Leclerc, “Optical and electrochemical transducers based on functionalized conjugated polymers,” *Advanced Materials*, vol. 11, no. 18, pp. 1491–1498, 1999.
- [32] W. J. Bae, K. H. Kim, W. H. Jo, and Y. H. Park, “A water-soluble and self-doped conducting polypyrrole graft copolymer,” *Macromolecules*, vol. 4, no. 38, pp. 1044–1047, 2005.
- [33] S. Kuwabata, K. Okamoto, and H. Yoneyama, “Conductivity of polypyrrole films doped with aromatic sulphonate derivatives,” *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 1, no. 84, pp. 2317–2326, 1988.
- [34] V. Pillay, T. S. Tsai, Y. E. Choonara, L. C. Du Toit, P. Kumar, G. Modi, D. Naidoo, L. K. Tomar, C. Tyagi, and V. M. K. Ndesendo, “A review of integrating electroactive polymers as responsive systems for specialized drug delivery applications,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 102, no. i, pp. 2039–2054, 2014.
- [35] L. Wang, X. Li, and Y. Yang, “Preparation, properties and applications of polypyrroles,” *Reactive & Functional Polymers*, no. 47, pp. 125–139, 2001.
- [36] H. Eisazadeh, “Studying the characteristics of polypyrrole and its composites,” *World Journal of Chemistry*, vol. 2, no. 2, pp. 67–74, 2007.
- [37] O. Pyshkina and V. Sergeyev, “Poly(3,4-ethylenedioxythiophene):synthesis and properties,” *Scientific Journal of Riga Technical University*, vol. 21, pp. 51 – 54, 2010.
- [38] M. Andersson, W. Mammo, T. Olinga, M. Svensson, M. Theander, and O. Inganäs, “Synthesis of regioregular phenyl substituted polythiophenes with fec13,” *Synthetic Metals*, no. 101, pp. 11 – 12, 1999.
- [39] L. Tong, K. Skorenko, A. Faucett, S. Boyer, J. Liu, J. Mativetsky, W. Bernier, and W. Jones Jr., “Vapor-phase polymerization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) on commercial carbon coated aluminum foil as enhanced electrodes for supercapacitors,” *Journal of Power Sources*, no. 297, pp. 195 – 201, 2015.
- [40] J. P. Lock, S. G. Im, and K. K. Gleason, “Oxidative chemical vapor deposition of electrically conducting poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films,” *Macromolecules*, no. 39, pp. 5326 – 5329, 2006.
- [41] I. I. C. Ropio, “Biobaterias alimentadas por glucose para aplicações médicas,” Master’s thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2015.
- [42] G. A. Mabbott, “An introduction to cyclic voltammetry,” *Journal of Chemical Education*, vol. 60, no. 9, pp. 697 – 702, 1983.

- [43] D. Svirskis, J. Travas-Sejdic, A. Rodgers, and S. Garg, “Electrochemically controlled drug delivery based on intrinsically conducting polymers,” *Journal of Controlled Release*, no. 146, pp. 6–15, 2010.



## Apêndice A

# Espectros e perfis de liberação do fármaco

Neste apêndice encontram-se os espectros e os respectivos perfis de liberação obtidos nas diferentes condições (passivas e estimuladas) durante os ensaios de liberação. As Figuras A.1, A.2, A.3 e A.4(a) dizem respeito a membranas electrofiadas de AC:IBP, as Figuras A.4(b), A.5, A.6 e A.7(a) às membranas obtidas por electrofiação coaxial de AC(out):IBP(in) e a Figura A.7(b) à membrana electrofiada de AC:IBP revestida de PEDOT. Para todas as figuras apresentadas, existem barras de erro apenas para os pontos onde este é maior, sendo que as curvas em si são obtidas através de mais pontos.

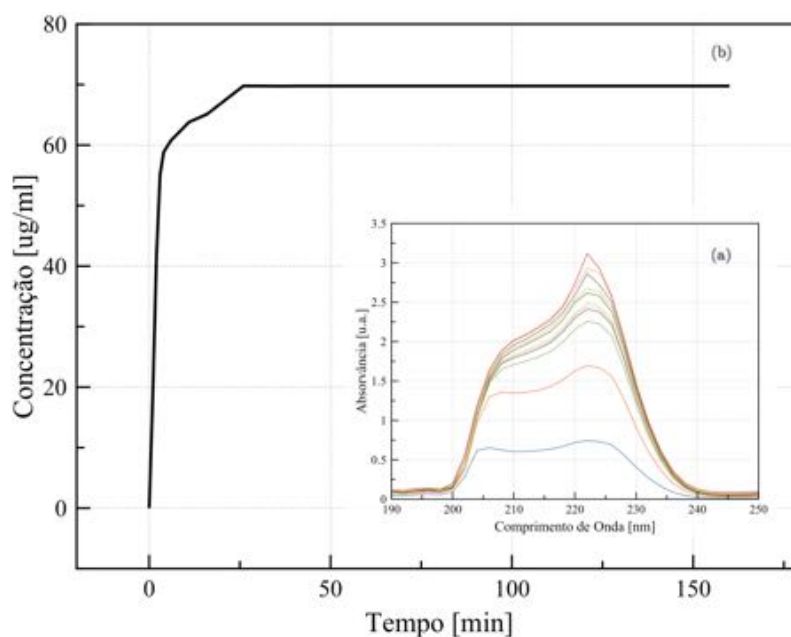
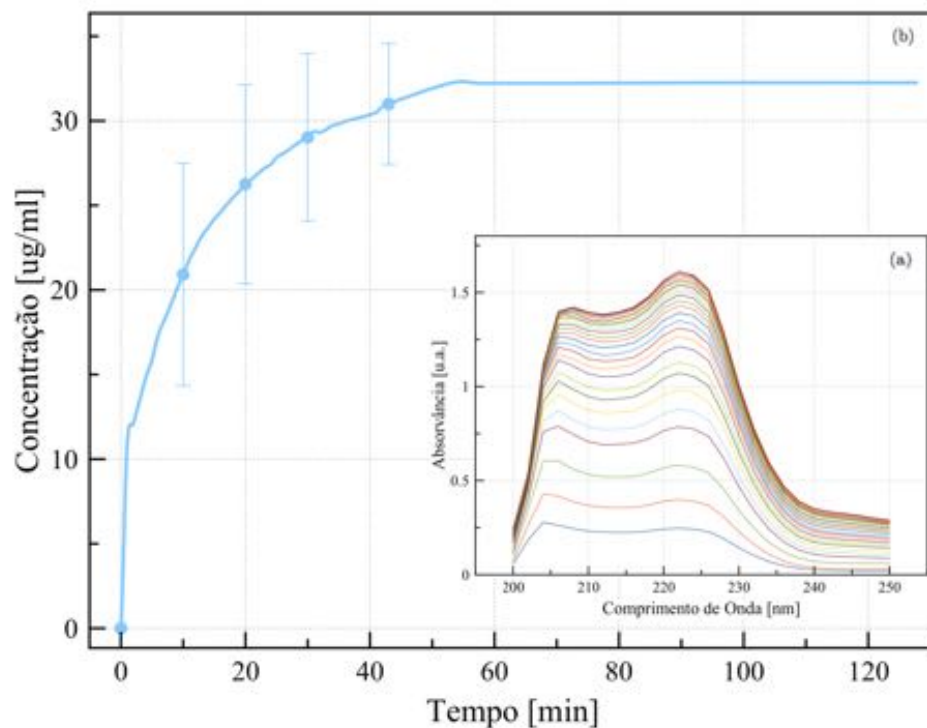
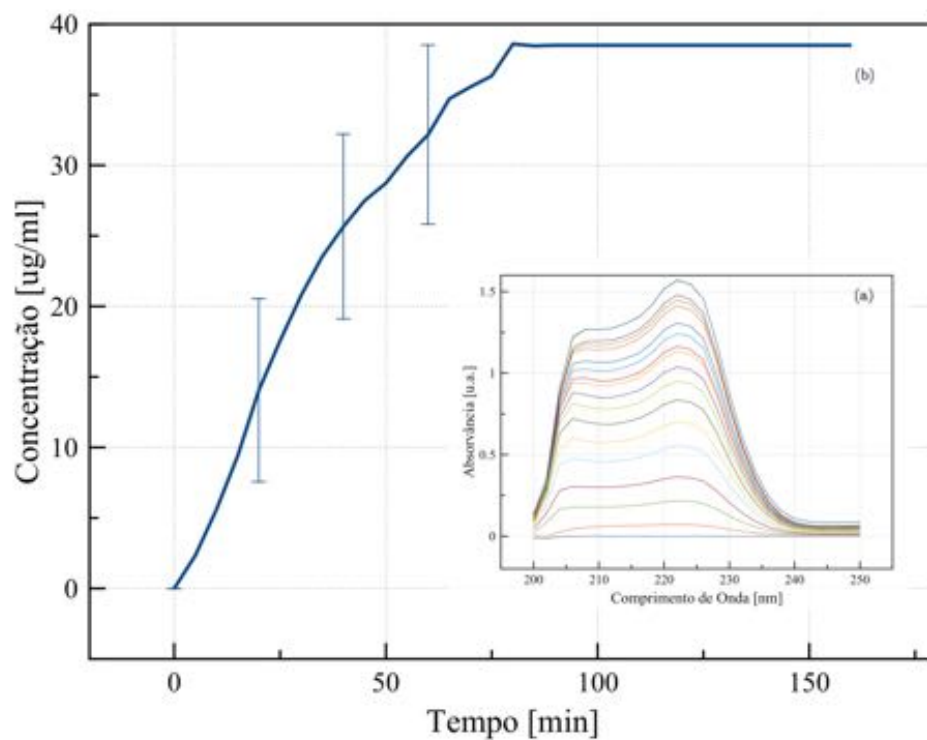


Figura A.1: Espectro de absorvâncias e perfil de liberação correspondente para a difusão de membranas electrofiadas não revestidas de AC:IBP

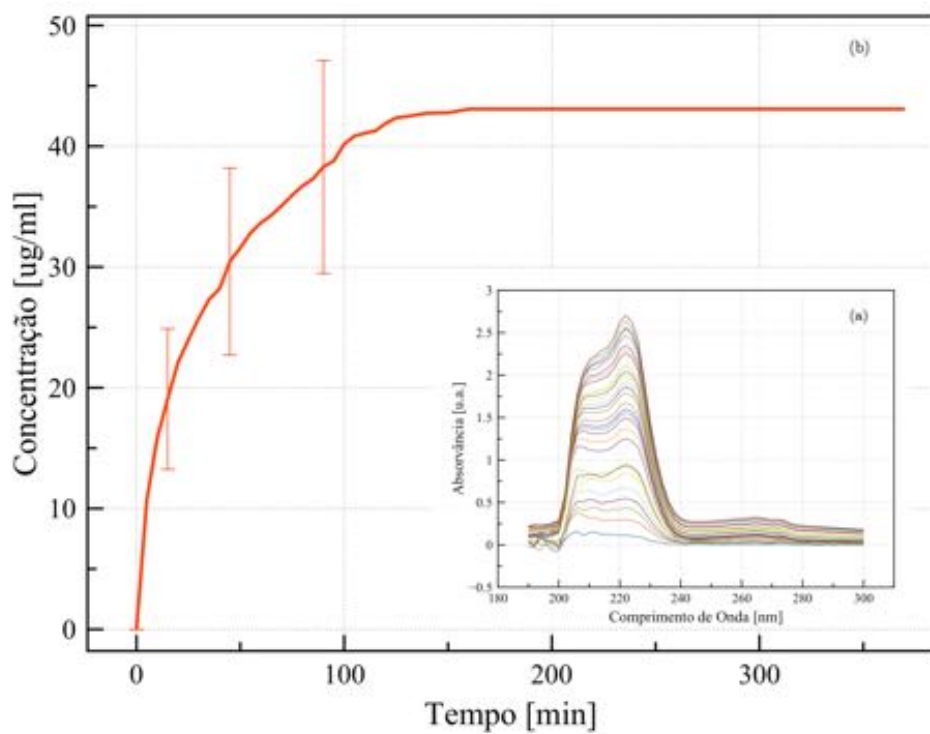


(a) mAC:IBP/PPy - difusão passiva

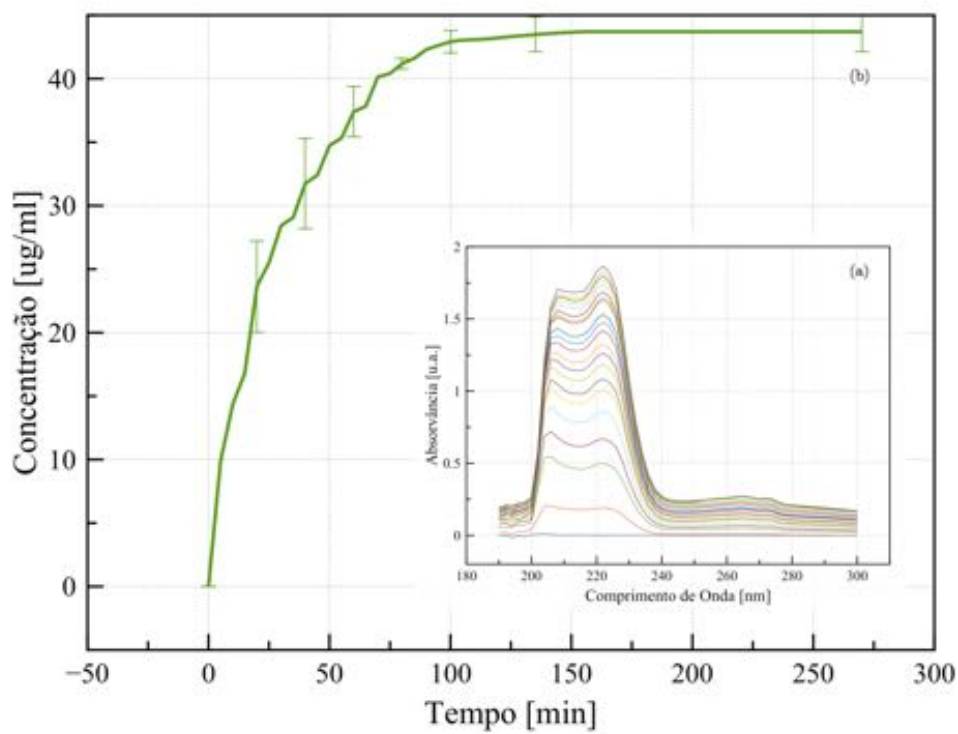


(b) mAC:IBP/PPy - 0,0 V

Figura A.2: Espectro de absorvâncias e perfil de liberação correspondente para a difusão passiva e 0V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPy

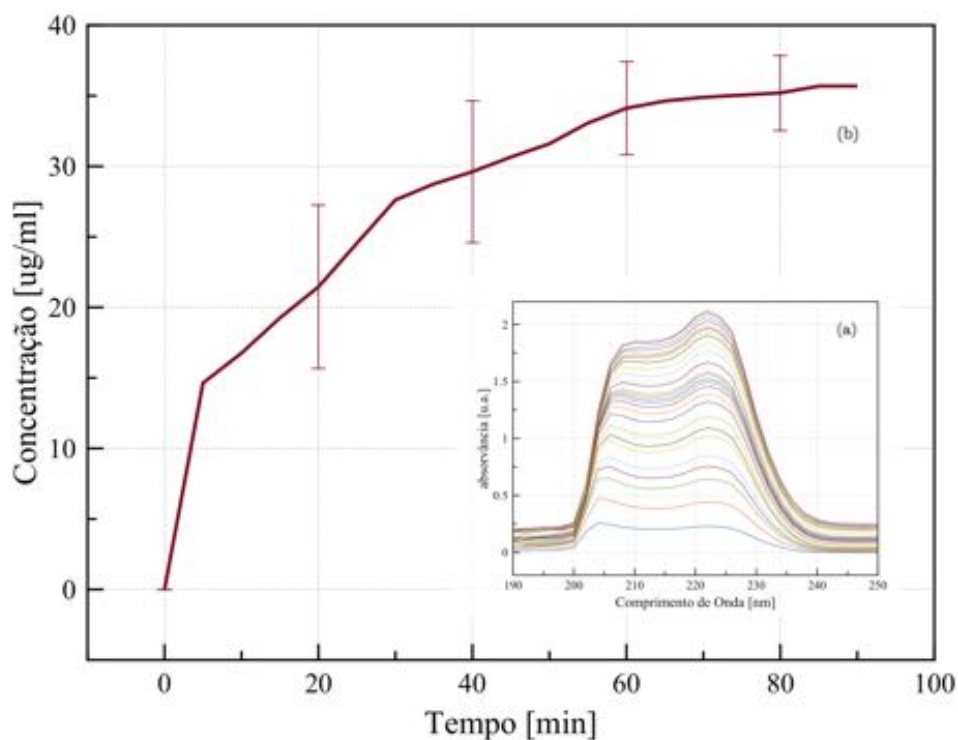


(a) mAC:IBP/PPy - 0,15V

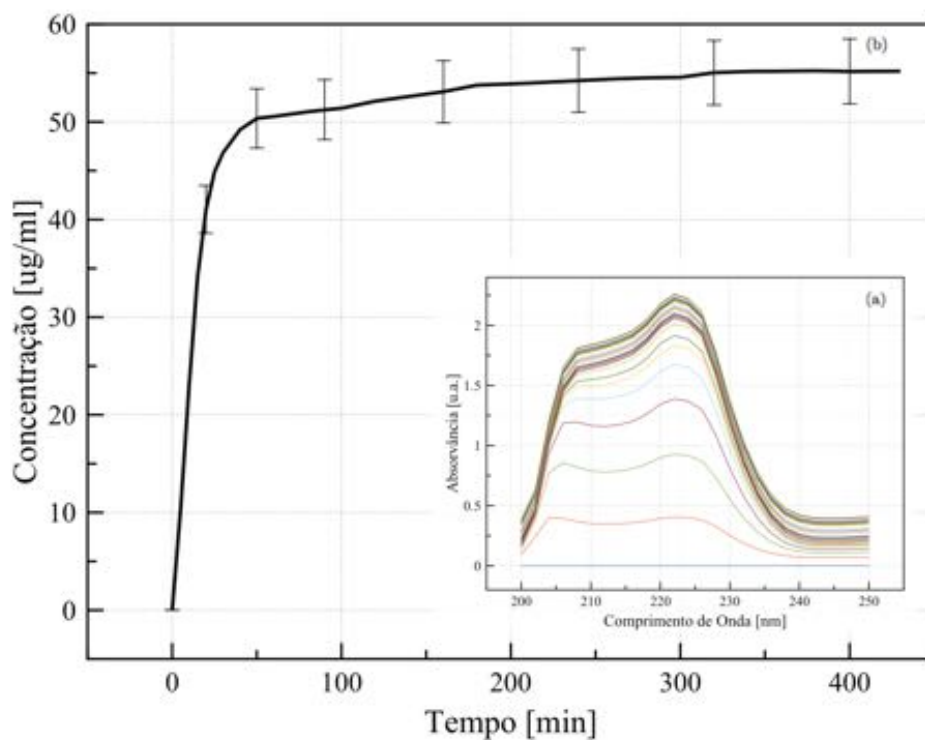


(b) mAC:IBP/PPy - 0,5V

Figura A.3: Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 0,15V e 0,5V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPy

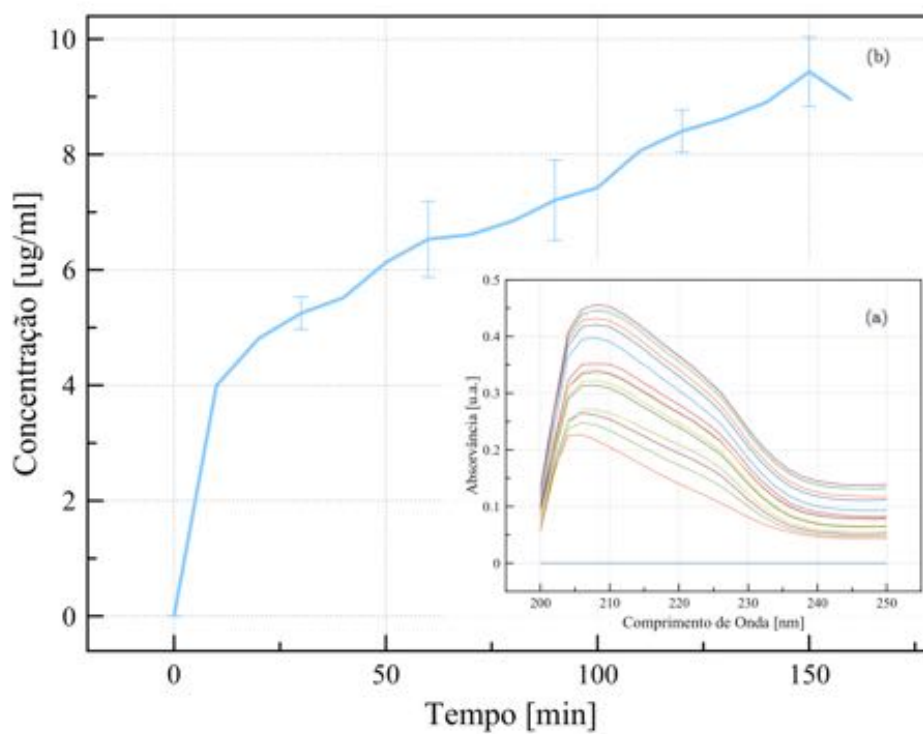


(a) mAC:IBP/PPy - 1,0V

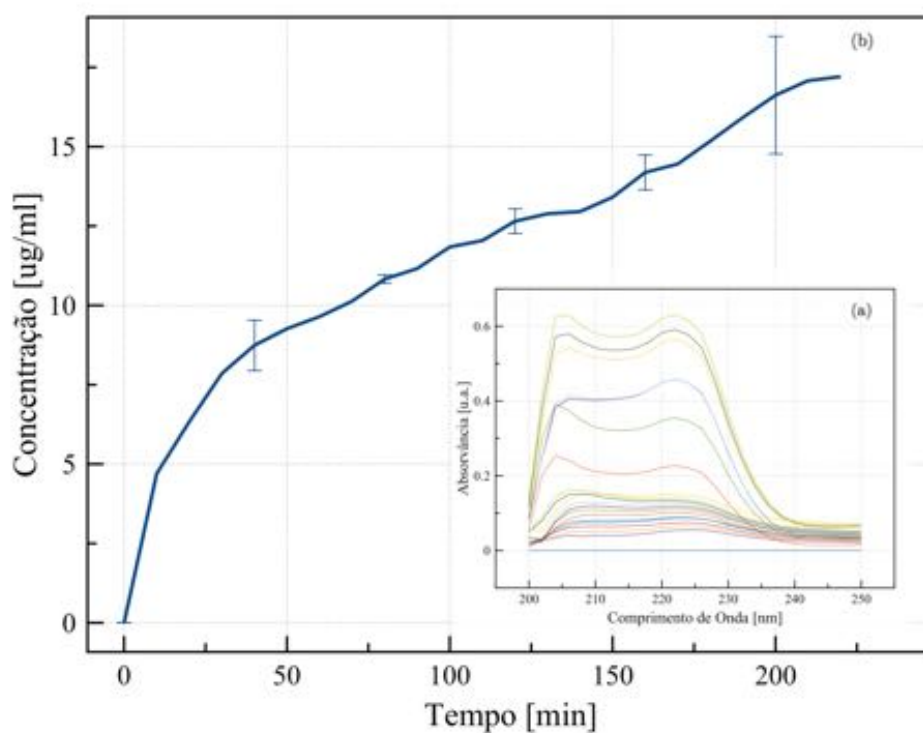


(b) cAC:IBP - difusão

Figura A.4: Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 1V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PPY (a). Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão de membranas co-electrofiadas não revestidas de AC(out):IBP(in) (b).

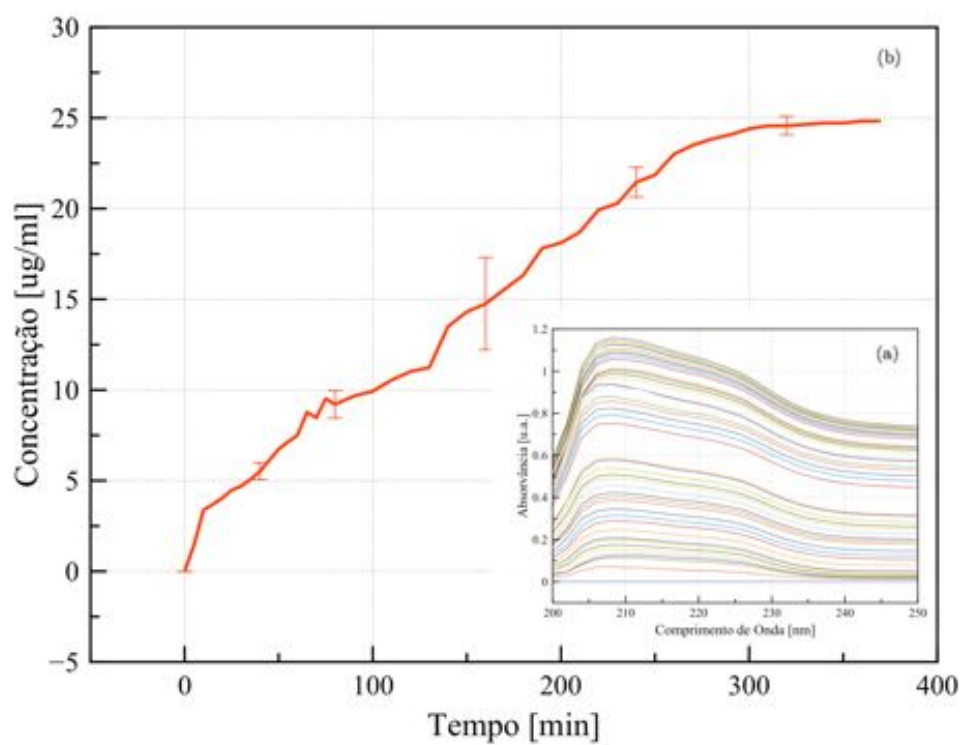


(a) cAC:IBP/PPy - difusão passiva

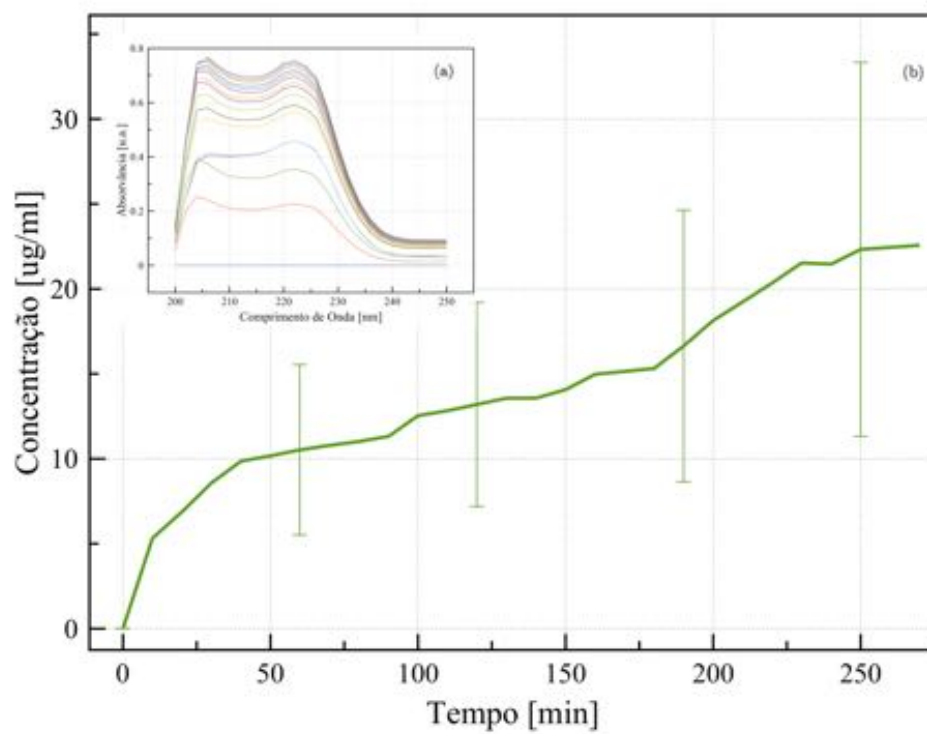


(b) cAC:IBP/PPy - 0,0V

Figura A.5: Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para a difusão passiva e para 0V de membranas co-eletrifiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy

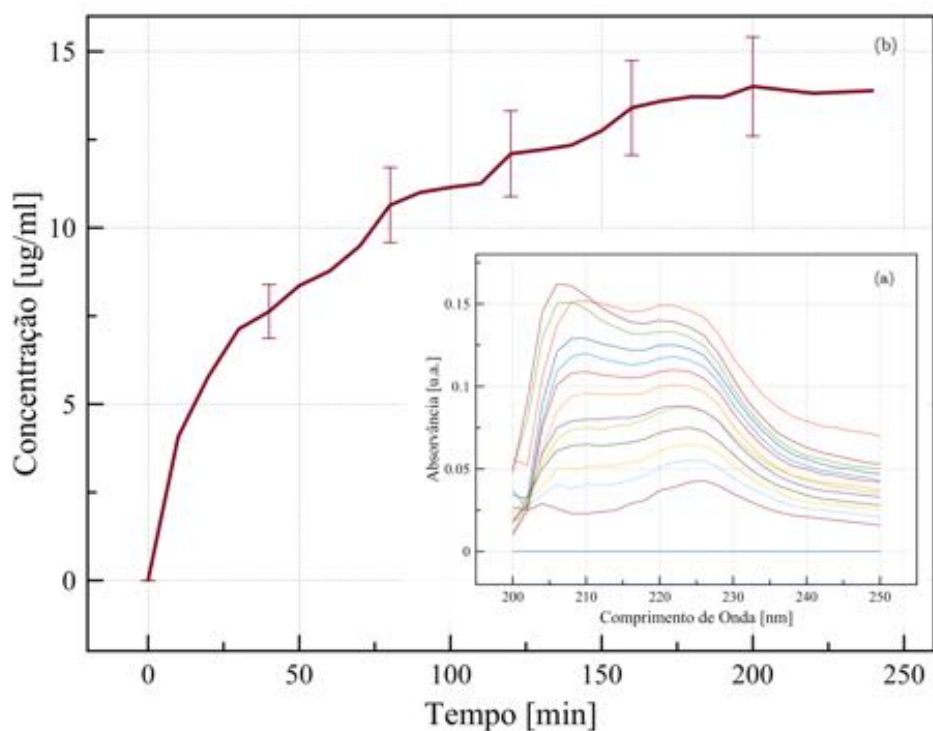


(a) cAC:IBP/PPy - 0,15V

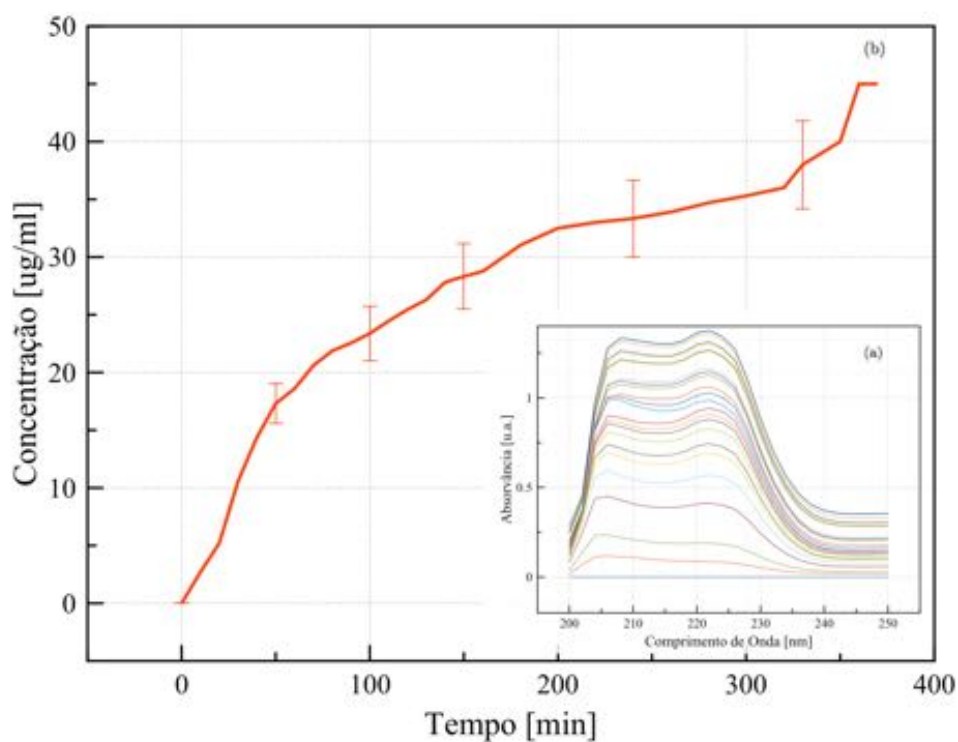


(b) cAC:IBP/PPy - 0,5V

Figura A.6: Espectro de absorvâncias e perfil de liberação correspondente para 0,15V e 0,5V de membranas co-electrofiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy



(a) cAC:IBP/PPy - 1V



(b) mAC:IBP/PEDOT - 0,15V

Figura A.7: Espectro de absorvâncias e perfil de libertação correspondente para 1V de membranas co-electrofiadas de AC(out):IBP(in) revestidas de PPy, e para 0,15V de membranas electrofiadas de AC:IBP revestidas de PEDOT.